

**Veränderung der Erkennungsspezifität  
ausgewählter Restriktions-  
Modifikationssysteme aus dem  
Bodenbakterium *Herpetosiphon giganteus***

Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaftlichen Fachbereiche  
(Fachbereich Biologie/Chemie)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**vorgelegt von**

**Linda Falgenhauer  
aus Gießen**

Gießen, im Januar 2012

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Manfred Kröger im Institut für Mikro- und Molekularbiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen im Zeitraum vom März 2009 bis März 2012 erstellt. Sie wurde durch ein Überbrückungsstipendium des Max-Delbrück-Vereins und durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen finanziert.

Erstgutachter: Prof. Dr. Manfred Kröger (Institut für Mikro- und Molekularbiologie FB08, JLU Giessen)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud (Institut für Biochemie FB08, JLU Giessen)

## Abkürzungen

Die verwendeten Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den internationalen IUPAC-Regeln.

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
<i>amp<sup>R</sup></i>	Ampicillinresistenz vorhanden
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Cam <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser (HPLC-Wasser)
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENase	Endonuklease
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
<i>Hgi</i>	<i>Herpetosiphon giganteus</i>
Kan <sup>r</sup>	Kanamycinresistente Bakterien
kb	Kilobasen
kDA	Kilo-Dalton
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
<sup>m</sup> C	C5-methyliertes Desoxy-Cytidin
μM	mikro-molar
mM	milli-molar
MTase	Methyltransferase
Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NEB	New England Biolabs



NTP (dNTP) nt	Nucleosidtriphosphat (desoxy-Nukleosidtriphosphat) Nukleotide
OD <sub>x</sub> ori	Optische Dichte (an der Wellenlänge x) Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
PAGE pHK662/HB101 pKF26/HB101 pM pXXX	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit pHK662 vormethylierte HB101- <i>E.coli</i> -Zellen mit pKF26 vormethyliert HB101- <i>E.coli</i> -Zellen pico-molar Plasmid XXX
rpm RT	Umdrehungen pro Minute Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE TEMED <i>tet</i> <sup>R</sup> Tet <sup>r</sup> Tet Tris	Trishydroxymethylaminomethan-Borsäure-EDTA-Puffer N,N,N,N,-Tetramethyldiamin Tetrazyklinresistenz Tetrazyklinresistente Bakterien Tetrazyklin Trishydroxymethylaminomethan (in der Variation Pufferan Bis-Hydroxy-mono-hydroxy-methyl-amino-methan der Firma ROTH - Karlsruhe)
TRD	<i>target recognition domain</i>
WT	Wildtyp
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
% (v/v) % (w/v) ø	Volumenprozent Gewichtsprozent Mittelwert

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	IV
Inhaltsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Restriktions-Modifikationssysteme .....	2
1.2 TypII RM-Systeme .....	4
1.2.1 TypII Restriktionsenzyme .....	4
1.2.2 TypII-Methyltransferasen .....	5
1.3 C5-Methyltransferasen .....	6
1.4 Klonieren von Restriktionsmodifikations-Systemen .....	9
1.5 Regulationsmechanismen von RM-Systemen .....	10
1.5.1 Regulation über C-Proteine .....	10
1.5.2 Regulation über die Expressionsrate der Methyltransferase .....	12
1.5.3 Regulation durch Translationsstart-Maskierung .....	13
1.5.4 Regulation über direkte Interaktion mit Endonuklease .....	13
1.5.5 Regulation der Methyltransferase-Promotoren über negative Regulatoren .....	13
1.5.6 Regulation über <i>anti-sense</i> -RNAs .....	13
1.6 Mutagenese von RM-Systemen .....	14
1.7 Vorarbeit zu RM-Systemen aus <i>Herpetosiphon giganteus</i> .....	16
1.8 Eigene Vorarbeiten .....	20
1.9 Zielsetzung .....	24
2 Material .....	25
2.1 Enzyme .....	25
2.1.1 Restriktionsenzyme .....	25
2.1.2 DNA-Polymerase für PCR .....	25
2.1.3 DNA-Modifizierende Enzyme .....	25
2.1.4 Andere Enzyme .....	25
2.2 Chemikalien .....	25
2.3 Nährmedien .....	26
2.3.1 LB-Medium .....	26
2.3.2 Selektive Medien .....	26
2.3.3 Blau-Weiß-Selektion/GFP-Expression .....	26
2.3.4 Induktionsmedium .....	26

2.4	Puffer und Lösungen .....	27
2.4.1	Puffer Bisulfit-Reaktion .....	27
2.4.2	DNA- Elektrophorese-Puffer .....	27
2.4.3	Puffer für Plasmid-Isolierung .....	27
2.4.4	Puffer für Proteinaufreinigung .....	28
2.4.4.1	Puffer für Aufreinigung von Endonukleasen .....	28
2.4.4.2	Puffer für die Aufreinigung von Methyltransferasen .....	29
2.4.5	Puffer für SDS-PAGE .....	29
2.5	Bakterienstämme .....	31
2.6	Ausgangsplasmide .....	32
2.7	Oligonukleotide .....	33
2.8	DNA-Aufreinigungs-Kits .....	37
2.9	DNA-Marker .....	37
2.10	Proteinaufreinigung .....	38
2.11	Proteinmarker .....	38
3	Methoden.....	39
3.1	Plasmid-Isolierung in kleinem Maßstab (Minilysat) .....	39
3.2	<i>In vitro</i> Neukombination von DNA .....	39
3.2.1	Verdau von Plasmiden .....	39
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	40
3.2.3	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen .....	41
3.2.4	Aufreinigung von DNA nach Verdau oder PCR.....	41
3.2.5	Dephosphorylierung der isolierten DNA-Fragmente .....	42
3.2.6	Phosphorylierung von DNA mittels T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK).....	42
3.2.7	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	42
3.2.8	Klenow-Polymerase-Fill-In.....	43
3.2.9	Ligation .....	43
3.3	Herstellung kompetenter Zellen in kleinem Maßstab.....	43
3.4	Transformation von <i>E.coli</i> –Zellen mit neukombinierter DNA .....	44
3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	44
3.5.1	Polymerase-Ketten-Reaktion .....	44
3.5.2	Zielgerichtete Mutagenese mit einem Primerpaar ( <i>site directed mutagenesis</i> ) .....	46
3.5.3	Sequenzierung .....	48
3.6	Bisulfit-Reaktion .....	48
3.7	Expression, Aufreinigung und Analyse von ausgewählten Proteinen.....	50

3.7.1	Expression von Endonukleasen und Methyltransferasen.....	50
3.7.2	His-Tag-Aufreinigung von Proteinen.....	51
3.7.3	SDS-PAGE.....	52
4	Ergebnisse .....	53
4.1	ATGA-Klone .....	53
4.1.1	Klonierung der ATGA-Konstrukte in verschiedenen <i>E.coli</i> -Stämmen .....	54
4.1.2	Effekt von Dcm und/oder Vsr auf die Klonierung von ATGA-Klonen.....	55
4.1.3	Methylierungsaktivität ATGA-Klone .....	58
4.2	Zusätzliche Nebenaktivitäten Methyltransferasen.....	59
4.2.1	Wildtyp-Methyltransferasen.....	62
4.2.2	Nebenaktivität der Methyltransferase-Mutanten aus der Diplomarbeit.....	66
4.2.3	Nebenaktivität neuer Methyltransferase-Mutanten .....	71
4.3	Mutante R. <i>HgiBI</i> S176N .....	75
4.4	Expression von R. <i>HgiBI</i> S176N in Abhängigkeit homologer und heterologer Methyltransferasen und Kontrollproteine .....	83
4.4.1	M. <i>HgiEI</i> Varianten.....	83
4.4.1.1	Kombination von R. <i>HgiBI</i> S176N mit M. <i>HgiEI</i> -Mutanten aus Diplomarbeit .....	85
4.4.1.2	Kombination von R. <i>HgiBI</i> S176N mit neuen M. <i>HgiEI</i> -Mutanten .....	90
4.4.1.3	Transformation in mit M. <i>HgiBI</i> vormethylierte Zellen .....	92
4.4.2	Charakterisierung der 24bp-Deletions-Mutante.....	95
4.4.3	OrfC Varianten, Mutanten M. <i>HgiBI</i> .....	97
4.5	Nebenaktivität der Restriktionsenzyme .....	101
4.5.1	Herstellung von R. <i>HgiBI</i> /R. <i>HgiEI</i> -Mutanten .....	101
4.5.2	Ermittlung der Nebenaktivität.....	103
4.6	Überexpression der verkürzten Methyltransferase .....	113
5	Diskussion .....	120
5.1	Erste Herstellung der Mutante R. <i>HgiBI</i> S176N .....	121
5.2	Zusätzliche Spezifitäten von Methyltransferasen und Endonukleasen .....	122
5.3	Einfluss von M. <i>HgiBI</i> Varianten und Mutanten auf die Translation .....	124
5.4	Einfluss von M. <i>HgiEI</i> Translationsvarianten und Mutanten.....	126
5.5	Einfluss des kleinen Leserahmens C. <i>HgiEI</i> .....	128
5.6	Generierung einer fragmentierten Methyltransferase M. <i>HgiBI</i> ohne GGSCC-Aktivität .....	130
5.7	Klonierung von Methyltransferasen in <i>E.coli</i> BL21 .....	130
6	Abstract .....	132
7	Zusammenfassung.....	133

8	Literatur .....	134
9	Anhang .....	141
9.1	Vektoren .....	141
9.2	Herstellung von Plasmiden .....	152
9.2.1	Herstellung des Plasmides pKF11 .....	152
9.3	Bedingungen für den Verdau von pKF10 .....	153
9.4	Originaldaten Nebenaktivitäten .....	155
9.4.1	<i>R.HgiBI</i> Wildtyp .....	155
9.4.2	<i>R.HgiCII</i> WT .....	156
9.4.3	<i>R.HgiEI</i> WT .....	157
9.4.4	Mutanten <i>R.HgiBI</i> .....	159
9.4.5	<i>R.HgiEI</i> Mutanten .....	161
9.4.6	Nebenaktivität <i>R.HgiBI</i> S176N $\Delta$ 24 .....	165
9.4.7	Nebenaktivität Deletionsmutante <i>R.HgiBI</i> $\Delta$ 24 .....	166
10	Erklärung .....	167
11	Danksagung .....	168

# 1 Einleitung

Bakterien sind mit wenigen Ausnahmen Einzeller und besitzen kein extrazelluläres Abwehrsystem. Alle Reaktionen auf Änderungen innerhalb ihrer Umwelt erfolgen daher intrazellulär. So muss auch die Abwehr von in die Zelle eindringender Fremd-DNA, z.B. Bakteriophagen oder Plasmiden, innerhalb der Zelle erfolgen. Das bedeutet, Bakterienzellen müssen in der Lage sein, fremde und eigene DNA zu unterscheiden.

Nachdem zunächst LURIA und HUMAN (1952) und BERTANI und WEIGLE (1953) beschrieben haben, dass Bakterien fremde DNA abbauen können, wurde durch ARBER und DUSSOIX (1962) die Modifizierung von DNA zum Schutz der wirtseigenen DNA entdeckt und als Wirtsspezifität bezeichnet. Der Bakteriophage  $\lambda$  überlebte mit hoher Rate, wenn er von *E.coli* K entweder auf *E.coli* K zurück oder neu auf *E.coli* C gesetzt wurde. Derselbe Bakteriophage  $\lambda$  überlebte allerdings nur mit geringer Effizienz, wenn er von *E.coli* C auf *E.coli* K gesetzt wurde. Dies zeigt, dass nur der Bakterienstamm *E.coli* K ein Modifikationssystem besitzt.

Aus dieser grundlegenden Beobachtung wurde klar, dass es ein Zusammenspiel von modifizierenden, also schützenden Enzymen, und Nukleasen gibt. Das war ein wesentlicher Schritt auf dem Weg zur modernen Gentechnik. Damit war auch bald ein kommerzielles Interesse vorhanden, weil man abhängig von der Auswahl bekannter Nukleasen immer genauer DNA-Fragmente charakterisieren konnte. So wurde auch das wissenschaftliche Interesse an diesen Enzymen geweckt. Hier erwies es sich allerdings so lange als unmöglich, die Gene für die Nukleasen zu klonieren, als man nicht auch die zugehörigen modifizierenden Enzyme, die so genannten Methyltransferasen, in die Klonierung einbezog. Diese so genannten Restriktions-Modifikationssysteme (RM-Systeme, oder abgekürzt RM. vor dem Namen) sind regelmäßig durch benachbarte Gene kodiert. Erst durch die Verwendung von Stämmen, die keine Abwehr gegen Fremdmethylierung besitzen, gelang es, zahlreiche Systeme erfolgreich zu klonieren. Ungeklärt ist aber nach wie vor, warum gewisse RM-Systeme als unklonierbar gelten.

Für die Wissenschaft stellt sich die Frage nach dem Ursprung dieser Systeme als schier unlösliches Problem dar. Dabei sind zwei Fragen von besonderem wissenschaftlichem Interesse: Warum kann man zwischen Methyltransferase und Endonuklease keine strukturelle Gemeinsamkeit erkennen, obwohl beide Proteine dieselben Erkennungsstellen an der DNA erkennen? Wie sind die Veränderungen der Systeme in der Evolution entstanden? Die zweite Frage ist deshalb so wichtig, weil eine Veränderung der Erkennungssequenz immer zwei Enzyme gleichzeitig betreffen muss. Will man nur die Erkennungsspezifität der Endonuklease verändern, so muss man darauf verzichten, mit biologischen Systemen zu arbeiten. Will man jedoch die Vorteile der biologischen Herstellung von Proteinen nutzen, muss man zuerst die Methyltransferase entsprechend ändern. Ohne ihren entsprechenden Schutz wird die Zelle durch die Endonuklease von innen angegriffen

und kann selbst bei sehr guter Regulation noch so viel Schaden anrichten, dass keine Wirtszelle überlebt. Umgekehrt muss die Natur einen Weg gefunden haben, um neue RM-Systeme zu entwickeln. Um diesen Weg nachzuvollziehen, muss man zunächst den Aufbau und die Organisation der RM-Systeme kennen. Diese sollen im Folgenden zunächst vorgestellt werden. Danach sollen die Systeme, mit denen hier gearbeitet werden soll, im Detail besprochen werden, um schließlich eine Arbeitshypothese vorzustellen, wie die Evolution der RM-Systeme erfolgt sein könnte. Diese Hypothese soll in dieser Arbeit bewiesen werden.

## 1.1 Restriktions-Modifikationssysteme

Jedes RM-System beinhaltet mindestens zwei Funktionen. Die Endonuklease (ENase, oder abgekürzt mit R. vor dem Namen des Enzyms) spaltet DNA. Die Methyltransferase (MTase, oder mit dem Kürzel M. verdeutlicht) methyliert die wirtseigene DNA und schützt diese so vor dem Angriff der Endonuklease. Die beiden Funktionen können auf getrennten Polypeptidketten liegen, aber auch auf einer einzelnen vereint sein, wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben wird.

Bei den RM-Systemen der Bakterien sind insgesamt vier große Gruppen beschrieben, Typ I, II, III und IV (BUJNICKI 2001). Sie sind nach der Reihenfolge der Entdeckung benannt und unterscheiden sich im Aufbau und in der Nutzung von ATP und den Cofaktoren. Typ I und III sind relativ ähnlich. Der neu gefundene Typ IV ist von großer Bedeutung für die Klonierung der RM-Systeme. Typ II-Systeme sind von großer wirtschaftlicher Bedeutung.

Bei den Typ I-RM-Systemen (MURRAY 2000) besteht das System aus drei unterschiedlichen Untereinheiten (Endonuklease, Methyltransferase und DNA erkennende Untereinheit). Verschiedene Kombinationen der Untereinheiten führen entweder zur Methylierung der DNA oder zum Schneiden derselben. Für die Methylierung der DNA wird nur der Komplex aus Methyltransferase und DNA erkennender Untereinheit benötigt, während für das Schneiden der Zielsequenz ein Komplex aus allen drei Untereinheiten gebildet werden muss. Mechanistisch ist dabei wichtig, dass dieser Komplex weiterhin DNA methylieren kann. Ob die DNA durch diesen Komplex methyliert oder geschnitten wird, hängt vom Methylierungszustand der Ziel-Sequenz ab. Für die Spaltung werden die Cofaktoren ATP, S-Adenosyl-L-Methionin und Magnesium-Ionen ( $Mg^{2+}$ ) benötigt, für die Methylierung S-Adenosyl-L-Methionin und  $Mg^{2+}$ -Ionen. Die Erkennungssequenz bei diesen Enzymen ist asymmetrisch und besteht aus zwei Teilen. Die Schnittstelle liegt sehr weit von der Erkennungsstelle entfernt (um 1000bp). Eine DNA-Translokation ist Voraussetzung für das Schneiden. Das bedeutet, dass unter ATP-Hydrolyse die

DNA-Struktur verändert wird. Der Schnitt ist unvollständig. Ein Beispiel für diese Systeme ist RM.*EcoE*. Es wurde erstmals von ARBER und WAUTER-WILLIAMS (1970) beschrieben.

Die RM-Systeme des Typ III wirken wie die Typ I-RM-Systeme als Komplexe. Im Gegensatz zu diesen beinhalten sie aber nicht drei verschiedene Untereinheiten, sondern lediglich zwei, nämlich eine Endonuklease (genannt *Res* für Restriktion) und eine Methyltransferase (genannt *Mod* für Modifikation). Die Methyltransferase kann, wenn sie einzeln vorliegt, DNA methylieren. Ausschließlich die Methyltransferase-Untereinheit trägt eine sogenannte *target recognition domain* zur Erkennung der Zielsequenz. Treffen zwei Komplexe aus jeweils zwei Methyltransferase- und zwei Endonuklease-Untereinheiten aufeinander, so kann die Spaltung der DNA erfolgen. Die essentiellen Cofaktoren für die Spaltung sind ATP und  $Mg^{2+}$ -Ionen. S-Adenosyl-L-Methionin wirkt dabei stimulierend. Für die Methylierung werden wie bei den Typ I-RM-Systemen S-Adenosyl-L-Methionin und  $Mg^{2+}$ -Ionen benötigt. Es erfolgt ebenso eine Translokation der DNA. Die Erkennungssequenz dieser Typ III-Systeme ist asymmetrisch. Der Schnitt wird 25 bis 27bp entfernt von der Erkennungsstelle durchgeführt. Ein Beispiel für diesen Typ ist RM.*StyLTI* (MURRAY 2000).

Die Typ IV-RM-Systeme enthalten lediglich eine Endonuklease. Trotzdem werden sie als vollständige RM-Systeme klassifiziert, weil sie nur nach Methylierung der DNA durch eine fremde Methyltransferase wirken. Sie benötigen für das Schneiden der DNA die Cofaktoren  $Mg^{2+}$ -Ionen und GTP. Sie erkennen wie die Typ I-RM-Systeme eine Sequenz aus zwei Teilen. In diese Klasse gehören zum einen die *mcrA-mcrBC*-Systeme (*modified cytosin restriction*) von *E.coli* (RALEIGH und WILSON 1986, NOYER-WEIDNER *et al.* 1986, RALEIGH *et al.* 1989), zum anderen auch das *mrr*-System (*methyated adenine recognition and restriction*, WAITE-REES *et al.* 1991). Diese Systeme scheinen nicht essentiell für die Wirtszelle zu sein. Sie wurden offenbar als Teile von Bakteriophagen durch Transfektion erworben und dienen als Teil von Prophagen jetzt zur Abwehrreaktion gegen Fremdmethylierung. Sie stellen daher ein großes Hindernis bei der Klonierung von Methyltransferasen dar, da diese die genomische DNA methylieren, so dass die Zelle durch die Abwehrsysteme „von innen“ abgebaut wird. Da solche Zellen nicht lebensfähig sind, benutzt man zur Klonierung von RM-Systemen Stämme, die in den genannten Abwehrsystemen defekt sind.

Quasi nur die Typ II-RM-Systeme sind von größerer wirtschaftlicher Bedeutung. Sie stellen die wesentlichen Enzyme in der Gentechnik dar. Da die in dieser Arbeit bearbeiteten RM-Systeme diesem Typus angehören, soll im Folgenden näher auf die Typ II-Systeme eingegangen werden.



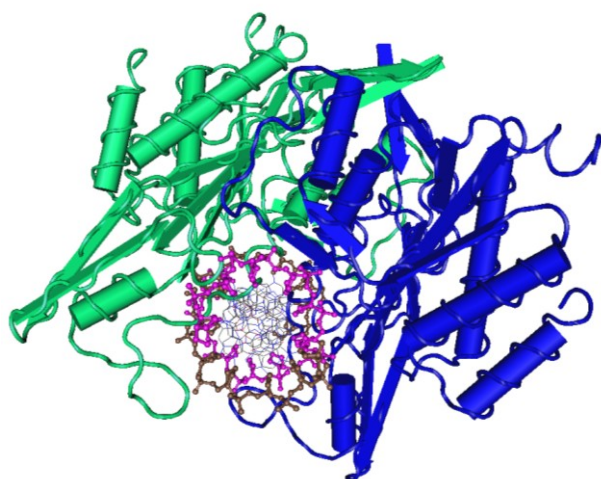
## 1.2 TypII RM-Systeme

Zu den Typ II- RM-Systemen gehören sehr viele Sub-Typen (Typ IIA bis IIT, PINGOUD *et al.* 2005). Restriktionsenzyme des Typ II können sogar verschiedenen Subtypen gleichzeitig angehören (EISENSCHMIDT 2005). Das ihnen allen gemeinsame Merkmal ist, dass sie spezifisch eine bestimmte Sequenz schneiden, und somit ein spezifisches Spaltmuster produzieren.

Die bekanntesten, typischen Typ II-RM-Systeme gehören dem Typ IIP an, sie erkennen palindromische Sequenzen, d.h. solche Sequenzen, die auf dem oberen wie auch auf dem unteren Strang gleich gelesen werden. Sie beinhalten separate Restriktionsenzyme und Methyltransferasen, die unabhängig voneinander wirken. Beide Enzyme besitzen eine DNA-Bindedomäne und erkennen zumeist dieselbe Sequenz. Die Restriktionsenzyme binden als Dimer an die DNA, und schneiden das Palindrom symmetrisch. Für das Schneiden der DNA benötigen die Typ II-Restriktionsenzyme  $Mg^{2+}$ -Ionen. Beispiele für die Klonierung der ersten RM-Systeme sind RM.*Bsu*RI (KISS *et al.* 1985) und RM.*Bam*HI (BROOKS *et al.* 1989). Die DNA darf in den meisten Fällen nicht modifiziert vorliegen. Es gibt wenige Ausnahmen bei den Typ II Endonukleasen, welche die DNA trotz Modifizierung schneiden (Typ IIM). Ein Beispiel hierfür ist *Dpn*I. Dieses Enzym ist bekannt, weil es zur Eliminierung von *template*-DNA aus PCR-Ansätzen (z.B. nach einer Mutagenese-PCR, beschrieben bei dem *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* von Agilent) verwendet werden kann.

### 1.2.1 TypII Restriktionsenzyme

Aufgrund der kommerziellen Bedeutung werden besonders die Typ II-Restriktionsenzyme untersucht. Die meisten dieser Restriktionsenzyme wirken als Dimer. Es gibt zahlreiche Röntgenstrukturen (PINGOUD *et al.* 2005), auf deren Grundlage sehr viele Mutagenese-Experimente durchgeführt worden sind. Die erste Struktur eines Typ II-Restriktionsenzym wurde für R.*Eco*RI durch MCCLARIN *et al.* (1989) gelöst. Sie erwies sich jedoch schnell als unzureichend interpretiert (GEIGER *et al.* 1989) und wurde deshalb kurz darauf von KIM *et al.* (1990) überarbeitet. Die dort ermittelte Sequenz des Homodimers R.*Eco*RI gebunden an eine spezifische DNA ist in Abbildung 1 dargestellt.



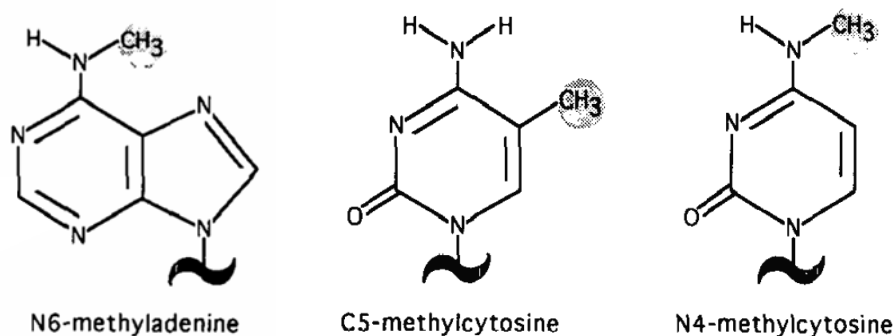
**Abbildung 1: Darstellung des Homodimers von *R.EcoRI* mit spezifisch gebundener DNA.** Diese Abbildung wurde mittels Cn3D (Version 4.3, herunterzuladen bei MMDB – MADEJ *et al.* 2012) aus der von KIM *et al.* (1990) ermittelten Röntgenstruktur (bei MMDB als 1ERI hinterlegt) erstellt. In blau und grün sind die beiden Moleküle von *R.EcoRI* dargestellt, die DNA in rosa und grau.

Die Restriktionsenzyme werden nach ihren katalytischen Domänen in verschiedene Familien eingeteilt (ORLOWSKI und BUJNICKI 2008). Die größte Familie ist die PD-(D/E)XK-Familie. Diese beinhaltet in der katalytischen Domäne eine besondere Aminosäuresequenz ((P)D...X<sub>n</sub>...(D/E)XK, dabei steht X für eine beliebige Aminosäure). Zu dieser Familie gehört z.B. *R.BamHI*. Weitere Familien sind die HNH-Familie (z.B. *R.KpnI*), die PLD-Familie (z.B. *R.BfiI*), die GYI-IYG-Familie (z.B. *R.Eco29kI*) und die HALFPIPE-Familie (z.B. *R.PabI*). Die Anzahl der Mitglieder dieser Familien sind bei ORLOWSKI und BUJNICKI (2008) aufgeführt, von (damals) 289 experimentell charakterisierten Endonukleasen des Typ II waren 199 aus der PD-(D/E)XK-Familie, 24 aus der HNH-Familie, sechs aus der GYI-IYG-Familie, drei aus der PLD-Familie, eine aus der HALFPIPE-Familie und 56 nicht-klassifizierte. Wurden auch solche Typ II-Endonukleasen mit in diese Berechnungen eingebracht, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht charakterisiert waren, veränderte sich zwar die Anzahl der Gruppenmitglieder deutlich, aber das Verhältnis zwischen den Gruppen blieb fast gleich. Eine Ausnahme bildete hierbei die PLD-Familie, deren prozentualer Anteil im Vergleich zur GYI-IYG-Familie zunahm.

### 1.2.2 TypII-Methyltransferasen

Die Methyltransferasen des RM-Typs II wirken im Gegensatz zu den Restriktionsenzymen zumeist als Monomere. In der lebenden Zelle ist ihr natürliches Substrat die hemimethylierte DNA. Hemimethylierte DNA wird in der Regel nicht geschnitten. Somit kann sie deutlich langsamer ihr Substrat erkennen. Die Funktion der Methyltransferasen scheint in der Evolution sehr früh entstanden zu sein. Man kann dieselbe Funktion z.B. auch bei der Thymidylatsynthase finden (JELTSCH 2002), also bei einem monomeren Substrat. Adenin-Methylierung ist offenbar ein allgemein gültiges Prinzip zur Unterscheidung zwischen alter und neusynthetisierter DNA.

Typ I-RM-Systeme zeigen oft die Methylierung des Adenins, die Methyltransferasen des RM-Typs II sind häufig C5-Methyltransferasen. Diese methylieren die DNA am Cytosin in Position C5. Die in Eukaryonten vorkommende DNA-Methylierung ist die C5-Methylierung und dient dort vornehmlich der Abschaltung von Promotoren. Methyltransferasen sind nicht nur für Polynukleotide bekannt, sondern auch in der Nukleotidsynthese und bei der Proteinreifung. Außerdem wird häufig RNA-Methylierung an den Zucker-Hydroxyl-Gruppen gefunden. Abbildung 2 zeigt die drei bekannten Arten der Basen-Methylierung.



**Abbildung 2:** Methylierungen der DNA (verändert nach CHENG, 1995), links N6-Methyladenin, in der Mitte C5-Methylcytosin, rechts N4-Methylcytosin. Grau hinterlegt ist die Methylgruppe.

Da in dieser Arbeit mit C5-Methyltransferasen gearbeitet wird, werden diese im Folgenden genauer vorgestellt.

### 1.3 C5-Methyltransferasen

Die C5-Methyltransferasen sind besonders gut untersucht. Das charakteristische Protein-Cystein-Motiv führt bei der Datenbank-Recherche besonders schnell zu zahlreichen spezifischen Treffern. Die Röntgenstrukturen zweier bakterieller C5-Methyltransferasen sind bekannt (*M.HhaI*, CHENG *et al.* 1993, *M.HaeIII*, REINISCH *et al.* 1995). Die erste Strukturanalyse wurde bei *M.HhaI* durchgeführt (CHENG *et al.* 1993 mit Cofaktor S-Adenosyl-L-Methionin, KLIMAŠAUSKAS *et al.* 1994 kovalent gebunden an ein mit Amino-Fluoro-Cytosin an der Zielstelle markiertem Oligonukleotid und mit dem Endprodukt S-Adenosyl-L-Homocystein), nachdem es zunächst durch ROBERTS *et al.* (1976) isoliert und durch CASERTA *et al.* (1987), WU und SANTI *et al.* (1988) und KLIMAŠAUSKAS *et al.* (1991) in größeren Mengen exprimiert worden ist. In Abbildung 3 ist die 1994 durch KLIMAŠAUSKAS *et al.* erhaltene Röntgenstruktur der Methyltransferase *M.HhaI* dargestellt.

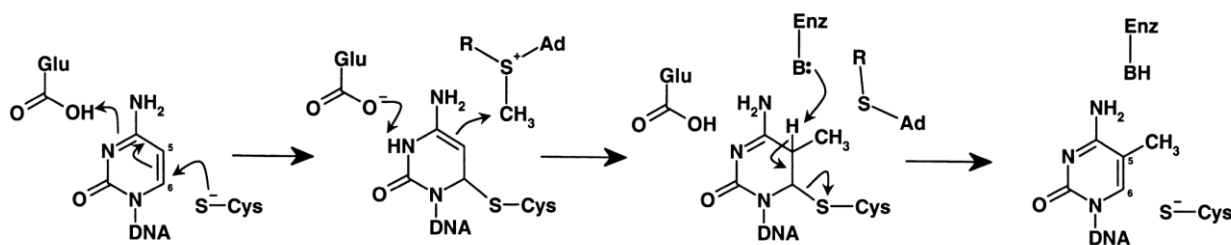


**Abbildung 3: Abbildung der Kristallstruktur der Methyltransferase *M.HhaI*, kovalent mit einem mit Fluorocytosin markierten Oligonukleotid verbunden und dem Produkt der Reaktion, S-Adenosyl-L-Homocystein.** Die Abbildung wurde KUMAR *et al.* (1994) entnommen.

Das Enzym besteht aus zwei Domänen. Die große Domäne bindet das Co-Substrat (S-Adenosyl-L-Methionin). Die kleine Domäne erkennt die DNA spezifisch und präsentiert die zu methylierende Base Cytosin. Ein ähnlicher Aufbau ist auch bei *M.HaeIII* zu finden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass man bei den C5-Methyltransferasen zahlreiche konservierte Aminosäurereste findet. So besitzen alle C5-Methyltransferasen zehn spezifische Motiv-Blöcke (PÓSAI *et al.* 1989). Von diesen zehn Motiv-Blöcken sind sechs hoch konserviert, vier davon weniger stark. Jeder dieser Blöcke besitzt eine definierte Funktion (KUMAR *et al.* 1994). Zwischen dem Block acht und neun befindet sich die *target recognition domain*. Diese ist von Methyltransferase zu Methyltransferase in der Aminosäuresequenz und Länge unterschiedlich, weil sie der Erkennung unterschiedlichster Sequenzen dient.

Besonderes Merkmal der C5-Methyltransferasen ist das oben erwähnte PC-Motiv (Prolin, Cystein), welches sich im Motiv-Block vier befindet. Es bildet den Mittelpunkt des katalytischen Zentrums. Ein zweites besonderes Merkmal der C5-Methyltransferasen ist das ENV-Motiv (Glutamat, Asparagin, Valin). Dieses dient der Erkennung und Aktivierung des zu methylierenden Desoxy-Cytidins.

Bereits vor dem Bekanntwerden der Röntgenstruktur ist der Mechanismus der Methylierung des Desoxy-Cytidins in Position fünf durch *M.HhaI* von WU und SANTI (1985, 1987) vorgeschlagen worden. Er wurde mehrmals leicht modifiziert (BAKER *et al.* 1988, SMITH *et al.* 1992, CHEN *et al.* 1991) und konnte durch die Strukturanalyse von CHENG *et al.* (1993) bestätigt werden. Ein Schema der Reaktion ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Darstellung des Reaktionsmechanismus der Methylierung des Desoxy-Cytidins an der Position fünf.** Die Abbildung ist dem Review von JELTSCH (2002) entnommen und basiert auf den Röntgenstrukturdaten des *M.HhaI*-DNA-Komplexes. Der Cysteinrest entstammt dem PC-Motiv, der Glutaminsäurerest dem ENV-Motiv.

Das Desoxy-Cytidin ist ein relativ reaktionsträges Molekül, und muss, damit es am Cofaktor (S-Adenosyl-L-Methionin) nukleophil angreifen kann, zunächst aktiviert werden. Hierbei greift das Cystein aus dem PC-Motiv (bei *M.HhaI* ist das Cystein 81) zunächst am C6 des zu modifizierenden Desoxy-Cytidins an. Gleichzeitig dient das Glutamat 119 aus dem ENV-Motiv unter Mitwirkung von Arginin 165 zur Protonierung von N4. Hiernach ist das C5 des Desoxy-Cytidins in der Lage, die Methylgruppe des S-Adenosyl-L-Methionins nukleophil anzugreifen. Danach wird das C5 deprotoniert, hierbei löst sich die Bindung des Cystein-Restes zum Desoxy-Cytidin und der Enzym-Desoxy-Cytidin-Komplex wird aufgelöst (JELTSCH 2002).

Das Desoxy-Cytidin wird nicht innerhalb der Basenstapel der DNA-Helix modifiziert, sondern außerhalb. Die zu modifizierende Base wird zunächst durch eine spezifische Aminosäure herausgeklappt und kann erst dann modifiziert werden. Diesen Vorgang des Herausklappens nennt man *base flipping*. Er wurde zum ersten Mal durch KLIMAŠAUSKAS *et al.* (1994) bei *M.HhaI* über Röntgenstrukturanalyse entdeckt und dann auch bei anderen Methyltransferasen gefunden. Während der Zeit, in der die Base methyliert wird, nimmt eine Aminosäure der Methyltransferase den Platz der Base ein (in *M.HhaI* ist das Glutamin 237), und interagiert seinerseits mit dem Desoxy-Guanosin.

Während die Bindung des Cofaktors und das *base-flipping* hoch konserviert sind, ist die Erkennung derselben DNA-Sequenz ganz offenbar nur mäßig konserviert. Allerdings kann man durch Sequenzvergleiche die Methyltransferasen nach Erkennungssequenz sortieren. (KRÖGER unpubliziert, JELTSCH *et al.*, 1995). Man erkennt auf diesem Weg jedoch bisher noch nicht die Aminosäuren, die für die Spezifität verantwortlich sind.

## 1.4 Klonieren von Restriktionsmodifikations-Systemen

Das Klonieren von RM-Systemen in *E.coli* als wirtschaftlich interessantestem Wirtsorganismus ist direkt nicht möglich (RALEIGH und WILSON 1986, NOYER-WEIDNER *et al.* 1986, WAITE-REES *et al.* 1991). Um ein komplettes RM-System zu erhalten, wird zunächst ein Plasmid, welches die Methyltransferase kodiert, in die Zelle eingeführt. Diesen Vorgang nennt man Vormethylierung der Zellen. Er wurde zum ersten Mal durch KISS *et al.* (1985) bei der Klonierung des RM-Systems RM.*Bsu*RI durchgeführt. Aufgrund der Nationalität des Autors wird das Verfahren als „ungarischer Trick“ bezeichnet. Nach der Vormethylierung sind alle Erkennungsstellen für die Methyltransferase methyliert, so dass die Restriktionsendonuklease weder chromosomale noch Plasmid-DNA schneiden kann. In einem zweiten Schritt wird das gesamte RM-System auf einem zweiten Plasmid in die Zelle eingebracht. Die neuen unmethylierten Erkennungsstellen für die Restriktionsendonuklease auf dem zweiten Plasmid können jetzt offenbar ausreichend schnell methyliert werden. Durch Selektion lässt sich das System dauerhaft etablieren. Das erste Plasmid geht häufig während der Zellteilung verloren. Diesen Vorgang nennt man *Curing*.

Die gesamte Prozedur ist aber nur in der Theorie einfach. In der Praxis ist häufig genug bereits die Klonierung von Methyltransferasen ein Problem. Wie oben beschrieben besitzt *E.coli* Abwehrsysteme gegen fremdmethylierte DNA, die *mcrA-mcrBC* und *mrr*-Systeme. Zellen, die das *mcrA-mcrBC* bzw. das *mrr*-System besitzen, können häufig nicht mit Methyltransferase-Genen transformiert werden. Es überleben dann nur solche Zellen, die keine aktive Methyltransferase exprimieren, also z.B. ein mutiertes Gen der Methyltransferase tragen.

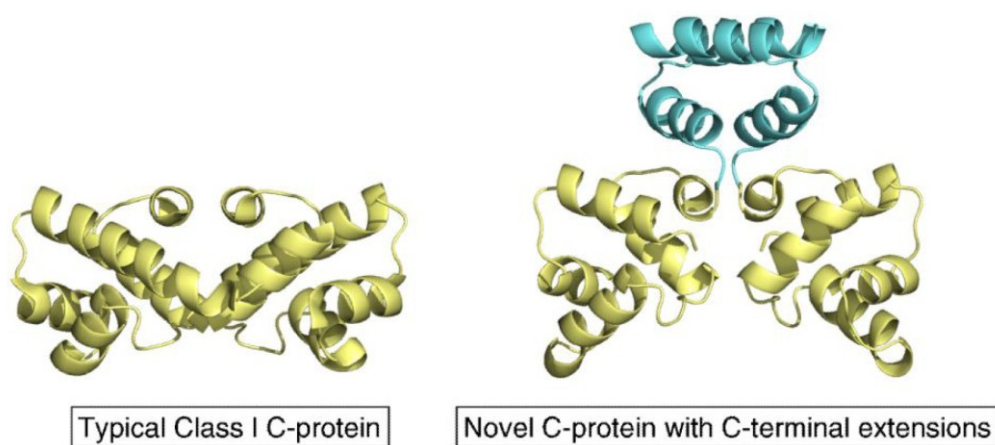
Aus diesem Grund muss man für die Klonierung von Methyltransferase-Genen *E.coli*- Stämme benutzen, bei denen das *mcrA-mcrBC* und das *mrr*-System dauerhaft z.B. durch Deletion mutiert sind. Die heutzutage zumeist benutzten Stämme sind z.B. SURE<sup>®</sup> (STRATAGENE) oder XL1-Blue MRF<sup>®</sup> (STRATAGENE). Der Stamm SURE<sup>®</sup> ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit für die Klonierung von Methyltransferase-Genen etwas weniger geeignet als XL1-Blue MRF<sup>®</sup>. Der Stamm HB101 (BOYER und ROULLAND-DUSSOIX, 1969), bei welchem lediglich das *mcrBC*-System deletiert ist, wurde von Düsterhöft (1990) und Erdmann (1991) erfolgreich für die Klonierung von RM-Systemen aus *Herpetosiphon giganteus* verwendet, auf die im Weiteren näher eingegangen wird.

## 1.5 Regulationsmechanismen von RM-Systemen

Sowohl Restriktionsenzyme als auch Methyltransferasen müssen zur Etablierung in der Zelle auf der Ebene der Genexpression streng reguliert werden, weil sie entweder die chromosomale DNA angreifen, oder die Methylierungsprodukte abgebaut werden. Hierbei sind verschiedene Mechanismen bekannt.

### 1.5.1 Regulation über C-Proteine

Der erste bekannte Mechanismus ist die Regulation der Endonukleasen auf Transkriptionsebene durch sogenannte C-Proteine (TAO *et al.* 1991, abgekürzt mit C. vor dem Namen). C-Protein steht für *control protein*. Es sind kleine Peptide, welche ein Helix-Turn-Helix-Motiv besitzen. Die C-Proteine wurden von SOROKIN *et al.* (2009) nach ihren vermuteten DNA-Erkennungssequenzen und nach der Aminosäuresequenz über bioinformatische Methoden in zehn unterschiedliche Gruppen eingeteilt (MCGEEHAN *et al.* 2011).



**Abbildung 5: Darstellung zweier Klassen von C-Proteinen.** In der linken Hälfte der Abbildung ist die Struktur der Klasse I C-Proteine zu finden, rechts diejenige, wie sie bei *C.Csp231I* from *Citrobacter* sp. RFL231 beobachtet worden ist. Diese Abbildung wurde MCGEEHAN (2011) entnommen.

C-Proteine sind in vielen Typ II RM-Systemen beobachtet und experimentell nachgewiesen worden, z.B. bei RM.*Bam*HI (IVES *et al.* 1992), RM.*Bgl*II (ANTON *et al.* 1997), RM.*Eco*72I (RIMŠELIENÈ *et al.* 1995), RM.*Eco*RV (ZHELEZNAYA *et al.* 2003), RM.*Pvu*II (VIJESURIER *et al.* 2000), RM.*Esp*1396I (ČESNAVIČIENÈ *et al.* 2003) und RM.*Kpn*2I (LUBYS *et al.* 1997). Zurzeit gibt es von vier C-Proteinen eine Kristall-Struktur, nämlich von *C.Ahd*I, *C.Bcl*II, *C.Esp*1396I und *C.Csp*231I (MCGEEHAN *et al.* 2011).

Die Regulation mittels C-Proteinen wird über eine sogenannte C-Box, die zum ersten Mal von RIMŠELIENÈ *et al.* (1995) als solche bezeichnet worden ist, gewährleistet. Entsprechend Abbildung 6 gibt es zwei Operatoren ( $O_L$  und  $O_R$ ), deren palindromische Halbsequenzen als C-Box



bezeichnet und auch 1A/1B und 2A/2B genannt werden (MRUK *et al.* 2007). Die Autoren der letztgenannten Arbeit formulieren für insgesamt 30 Systeme die Consensus-Sequenz GACT---AGTC---GACT---AGTC (vgl. Abbildung 6). Das hochkomplexe System nutzt die genannte Sequenz gleichzeitig als -10, bzw. als -35 Region für zwei Promotoren. Dieser Aufbau erinnert an das hochkomplexe Operator-Promotor-System  $O_R$ - $O_L$  aus dem Bakteriophagen  $\lambda$  (HENDRIX *et al.* 1983)

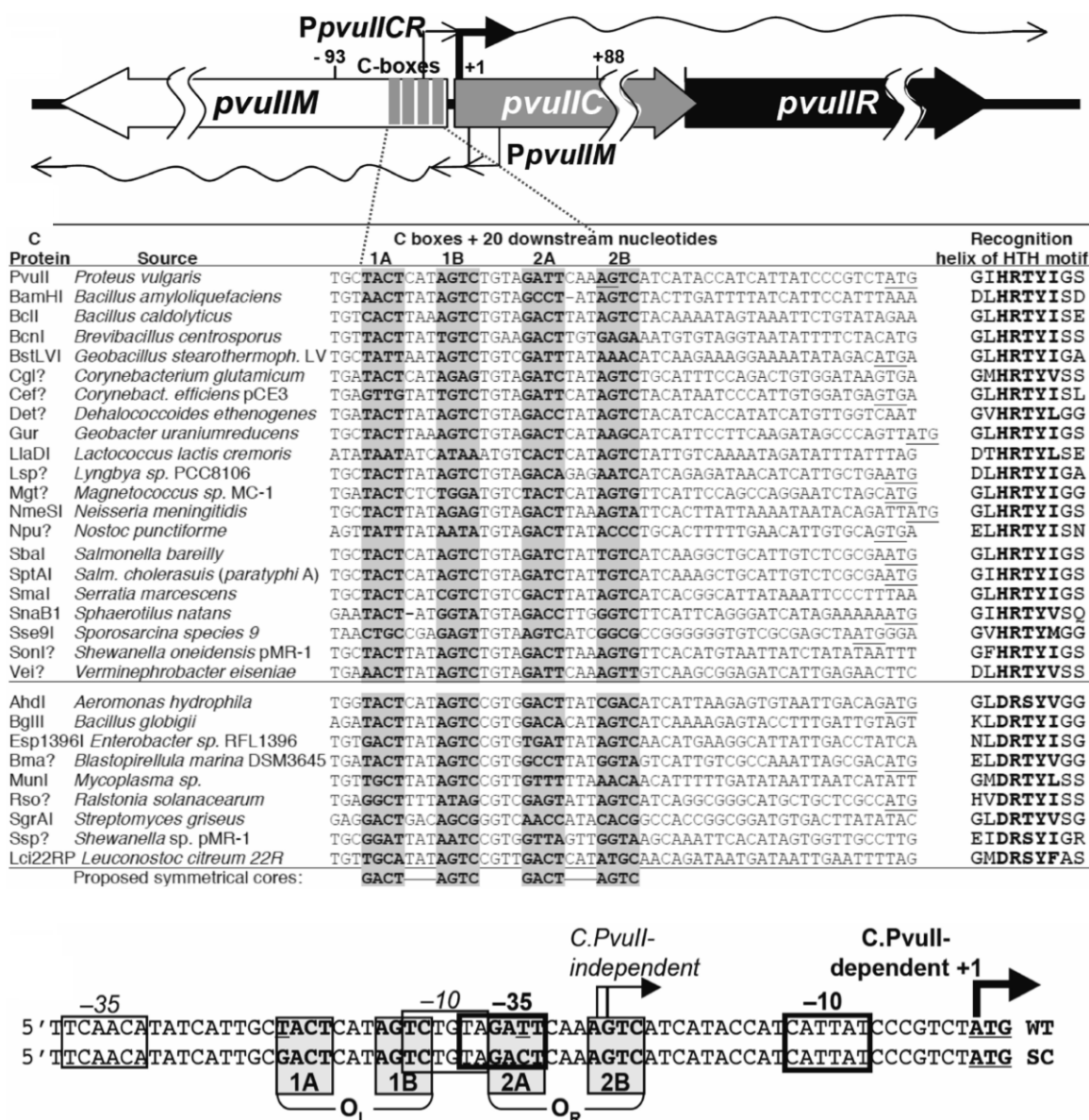


Abbildung 6: Darstellung der Organisation der C-Boxen am Beispiel von RM.PvuII und Ermittlung der Consensus-Sequenz aus 30 Systemen. Diese Abbildung wurde von MRUK *et al.* 2007 leicht verändert übernommen. WT= wildtypische Sequenz der C-Boxen bei RM.PvuII, SC= Consensus aus allen 30 Systemen.

Der weiter vom Promotor für C.PvuII und R.PvuII (genannt PpvullICR) entfernte Operator  $O_L$  wird bevorzugt mit einem Dimer von C-Proteinen besetzt. Erst bei einer sehr hohen Konzentration an C-Proteinen wird der Operator näher an PpvullICR besetzt ( $O_R$ ). Die Anlagerung an den ersten Operator führt zu einer Translationsaktivierung, die Anlagerung an Operatoren zu einer



Translationsrepression (NAGORNYKH *et al.* 2008). Eine andere Funktion scheint das C-Protein aus dem RM-System RM.*Kpn2I* (LUBYS *et al.* 1997) zu besitzen, dort reguliert es nicht die Expression der Endonuklease (diese ist konstitutiv exprimiert), sondern die Expression der Methyltransferase. Ohne das C-Protein ist die Expression der Methyltransferase zu hoch, also zu toxisch für die Wirtszelle, das RM-System kann dann nicht in der Zelle etabliert werden.

### 1.5.2 Regulation über die Expressionsrate der Methyltransferase

Eine Regulation der RM-Systeme kann auch direkt durch die Methyltransferase erfolgen. Hierbei gilt prinzipiell, dass die Methyltransferase-Expression zunächst nach Eintritt des RM-Systems in die Zelle hoch sein muss, um das Genom vor der Endonuklease zu schützen, danach aber herunterreguliert werden muss, um nicht fremd-eindringende DNA sofort zu methylieren und somit dem Abbau durch Endonukleasen zu entziehen (NAGORNYKH *et al.* 2008). In dem RM-System RM.*CfrBI* wird die Expression der Methyltransferase nach „getaner“ Arbeit herunterreguliert, indem die Promotoren von Endonuklease und Methyltransferase divergent überlappend angeordnet sind. Zunächst wird der Promotor der Methyltransferase abgelesen. Somit wird die Transkription der Endonuklease gehemmt. Im -35 Bereich des Promotors der Methyltransferase befinden sich zwei Erkennungssequenzen für M.*CfrBI*. Diese werden bei einer hohen Expression derselben schnell methyliert. Dadurch ist der Promotor für die RNA-Polymerase nicht mehr zugänglich, so dass der Promotor für die Endonuklease nicht mehr blockiert wird. Jetzt findet die Transkription des Endonuklease-Gens statt. Im RM-System RM.*LlaDI* findet man eine ähnliche Situation vor (Promotor mit Methylierungsstellen für die Methyltransferase), allerdings ist in diesem Falle die Endonuklease schwach konstitutiv exprimiert, d.h. es ändert sich nur die Expression der Methyltransferase und nicht die der Endonuklease. Einen derartigen Mechanismus kennt man sonst nur aus Eukaryonten zur dauerhaften Abschaltung von frühen Promotoren.

Eine andere Regulation auf Basis der Methyltransferase ist quasi eine Kombination aus C-Protein und Methyltransferase, wirkt aber negativ. Diese Regulation findet man bei RM.*EcoRII* (SOM *et al.* 1994), RM.*MspI* (SOM und FRIEDMAN 1997), RM.*SsoII* (KARYAGINA *et al.* 1997) und RM.*ScrFI* (BUTLER und FITZGERALD 2001). Hierbei ist die Methyltransferase am N-Terminus verlängert und trägt dort eine Helix-Turn-Helix-Domäne (ähnelt also den C-Proteinen, NAGORNYKH *et al.* 2008). Diese HTH-Domäne interagiert mit der Operator-Region des Methyltransferase-Gens und stoppt demzufolge ihre eigene Expression. Gleichzeitig wird dadurch der überlappende Promotor des Endonuklease-Gens frei und somit startet dessen Transkription.

### 1.5.3 Regulation durch Translationsstart-Maskierung

Ein ganz anderer Regulationsmechanismus wurde von BARANY *et al.* (1992) und MEYER-ROGGE (1993) am Beispiel des RM-Systemes RM.*TaqI* gezeigt. Dessen Methyltransferase überlappt mit dem Anfang des Endonuklease-Genes um 13 Codons. Das Startcodon der Endonuklease befindet sich in einem kleinen Hairpin-Loop, der in dieser Überlappung gebildet wird, und kann erst dann exprimiert werden, wenn die Methyltransferase komplett translatiert worden ist.

### 1.5.4 Regulation über direkte Interaktion mit Endonuklease

Bisher einzigartig ist ein Regulationsmechanismus, welcher bei dem RM-System PvuII beschrieben worden ist. Zusätzlich zu der oben beschriebenen Regulation über das C-Protein wird die Dimerisierung der Endonukleasen und somit die Bildung einer funktionellen Endonuklease-Einheit über ein Protein namens PvuIIW verhindert (ADAMS und BLUMENTHAL 1995).

### 1.5.5 Regulation der Methyltransferase-Promotoren über negative Regulatoren

Eine andere Art der Regulation der Methyltransferase-Transkription ist bei dem RM-System RM.*EcoRI* gefunden worden (LIU *et al.* 2007). Hier wirken sich zwei um mehr als 220bp vom Transkriptionsstart entfernte AT-reiche Bereiche negativ auf die Transkription des Methyltransferase-Gens aus. Als Mechanismus wird hier ein intramolekulares *DNA-looping* vermutet, welches auch als Regulationsmechanismus bei *lac*- und *gal*-Operons beschrieben wurde (MATTHEWS 1992).

### 1.5.6 Regulation über *anti-sense*-RNAs

Zusätzlich zu den in diesem Abschnitt schon genannten Mechanismen ist kürzlich bei der Regulation des plasmidcodierten RM-Systems RM.*EcoRI* erkannt worden, dass die Regulation auch mittels einer kleinen, in antisense-Richtung zu der Endonuklease codierten RNA durchgeführt wird (MRUK *et al.* 2011). Bei gleichmäßiger Zellteilung wird die Expression der Endonuklease in beiden Tochterzellen heruntergefahren. Bei ungleichmäßiger Zellteilung verbleibt nach Verlust des RM-Systems RM.*EcoRI* die Antisense-RNA in der Wirtszelle und wirkt jetzt toxisch.

## 1.6 Mutagenese von RM-Systemen

Trotz intensiver Suche ist es nicht gelungen, für alle theoretisch denkbaren Erkennungssequenzen jeweils ein natürlich vorkommendes Enzym zu finden (vgl. Katalog der Biotechnologiefirma „New England Biolabs“ Ausgabe 2011/12, Seiten 290 - 308). Das Interesse an neuen Restriktionsenzymen hat in den vergangenen Jahren ganz offenbar nachgelassen, weil durch die Entwicklung der Linker-PCR quasi jede beliebige Sequenz nukleotidgenau ausgeschnitten werden kann. Aus genau diesem Grund ist auch das Interesse an der artifiziellen Herstellung neuer Restriktionsenzyme stark zurückgegangen. Außerdem war es nach der Veröffentlichung der ersten Röntgenstrukturanalyse (*R.EcoRI*, McCLARIN *et al.* 1986) nicht gelungen, die Erkennungsspezifität durch gezielte Änderung der Gensequenz zu verändern (GEIGER *et al.* 1989). Dieses heute *rational protein design* genannte Verfahren hat auch später nur zu einer erweiterten, nicht aber zu einer wirklich neuen Erkennungsspezifität geführt (LANIO *et al.* 2000).

Dieser Weg muss als besonders schwierig angesehen werden, weil als Voraussetzung für die Herstellung veränderter Restriktionsenzyme ein wirksamer Schutz gegen diese neue Aktivität innerhalb der Zelle gegeben sein muss. Dieses könnte durch Genregulation, oder wie in der Natur durch die Methyltransferasen erfolgen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht, den einen oder anderen Weg zu beschreiten, ohne dass dabei eine generell anwendbare Methode gefunden wurde. Versuche zur Genregulation haben versagt, weil es nicht gelungen ist, die Genexpression komplett reversibel zu unterbinden. Bereits kleinste Mengen an Restriktionsenzym greifen das bakterielle Genom an und sind somit absolut letal. Alle überlebenden Zellen enthielten inaktive Enzymvarianten.

Der einzig denkbare Weg ist also eine vorgeschaltete Methylierung, so wie es in den natürlich vorkommenden RM-Systemen realisiert ist. Die gleichzeitige Anwesenheit von schützenden Methyltransferasen und aggressiven Endonukleasen wurde bereits von ARBER und DUSSOIX beschrieben (1962) und ist seither bei allen natürlichen Restriktionsenzymen beobachtet worden.

Will man dem Beispiel der Natur folgen, so muss man notgedrungen zwei Enzyme verändern. Im Gegensatz zum nachlassenden kommerziellen Interesse ist die damit verbundene Problematik aus wissenschaftlicher Sicht auch heute noch eine intellektuelle Herausforderung.

Auf der Basis aller bekannten Erkennungssequenzen und der zugehörigen Aminosäuresequenzen ist mehrfach versucht worden herauszufinden, ob und wie die Restriktionsenzyme miteinander verwandt sind, und wie sie während der Evolution auseinander hervorgegangen sein könnten. Die neueste Übersicht dazu geben ORLOWSKI und BUJNICKI (2008). Der erste Bericht zur Evolution von Restriktions-Modifikationssystemen stammt von KRÖGER *et al.* (1984) und bildet die Grundlage dieser Arbeit. Auffällig ist, dass man besonders bei den Methyltransferasen strukturelle

Gemeinsamkeiten findet, die sich mit Gemeinsamkeiten in der Spezifität korrelieren lassen (KRÖGER unpubl., JELTSCH *et al.* 1995).

Die erste erfolgreiche Veränderung der Erkennungssequenz einer Methyltransferase nutzte eine natürlich vorhandene Nebenaktivität des Enzyms aus, indem die Hauptmethylierung eines Adenin-Restes in die spezifische Methylierung eines Cytosin-Restes umgewandelt wurde (ROTH und JELTSCH, 2001), ohne dass auf Röntgenstrukturdaten zurückgegriffen werden konnte. COHEN *et al.* (2004) konnte auf eine solche Struktur zurückgreifen. Ihnen gelang unter Erhalt der Methylierungsposition der Wechsel von einer GGCC-Erkennung zu einer NGCC-Erkennung.

Dem Postulat von KRÖGER *et al.* (1984) entsprechen die Versuche von TIMÁR *et al.* (2004). Hier gelang durch ungezielte Mutagenese der Methyltransferase M.*SinI* der Wechsel von der Erkennung eines A-T bzw. T-A-Basenpaars zur Erkennung eines G-C bzw. C-G-Basenpaars. Dieses ungezielte Vorgehen führte zu insgesamt acht Aminosäureaustauschen, von denen mindestens zwei direkt an der Spezifitätsänderung beteiligt sind. Die neue Spezifität war als Nebenaktivität in der wildtypischen Methyltransferase M.*SinI* bereits vorhanden, so dass sie nicht als wirklich neu bezeichnet werden kann.

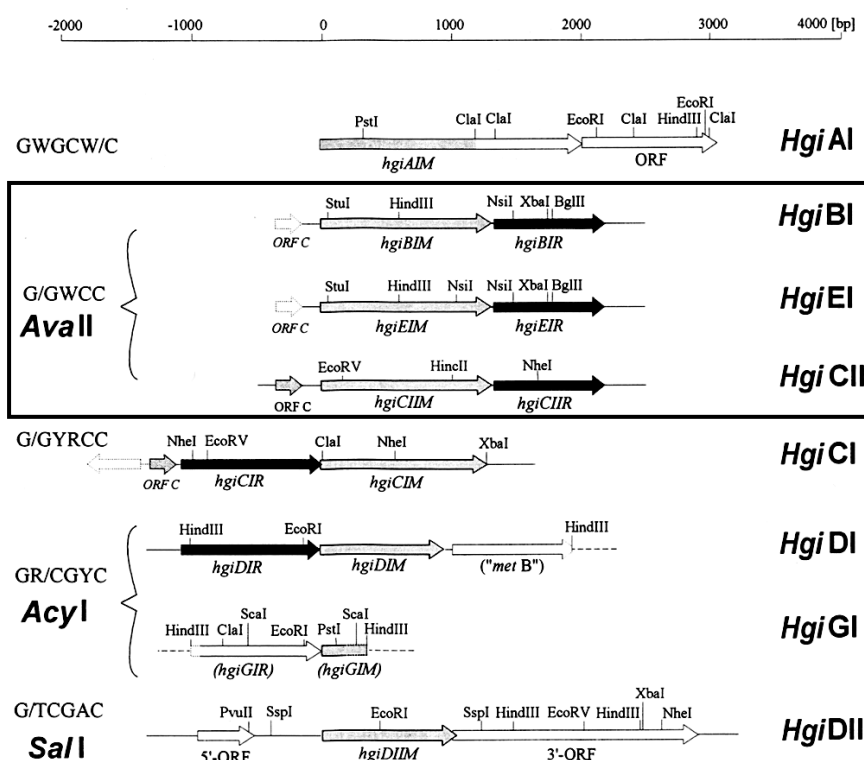
Analog zu den sog. multispezifischen Methyltransferasen (TRAUTNER *et al.* 1996) wurden auch multispezifische Endonucleasen gefunden. Auf der Basis dieser Sondersituation gelang der Austausch der Erkennungsdomänen (JURÉNAITÉ-URBANAVIČIENĖ *et al.* 2007) zu einem Enzym mit neuer Erkennungsspezifität. Wie bei den multispezifischen phagencodierten Methyltransferasen gehört zu jeder Spezifität eine eigene Domäne, so dass die einzelnen Domänen nur in ihrer Anordnung, nicht aber in ihrer Spezifität verändert werden mussten. Aus derselben Arbeitsgruppe der Biotechnologiefirma Fermentas in Litauen sind weitere ähnliche Berichte veröffentlicht worden, bzw. zu erwarten.

Entsprechende Versuche sind auch für die Endonuklease R.*KpnI* bekannt. SARAVANAN *et al.* (2008) ist es gelungen, die Nebenaktivitäten der Endonuklease *KpnI* durch Punktmutation zu eliminieren. Derartige Nebenaktivitäten sind als Star-Aktivität (\*-Aktivität) relativ häufig. Sie werden nur bei entsprechenden Salzbedingungen beobachtet. Hier gelang das Experiment nur, weil die schützende Methyltransferase die veränderte Spezifität abdeckt.

Seit der Veröffentlichung von SARAVANAN *et al.* (2008) sind in der Literatur keine Versuche zur Veränderung der Spezifität der Typ IIP-Endonucleasen mehr bekannt geworden. Allerdings wurden sehr viele Mutagenesen mit den Typ IIS-Endonucleasen durchgeführt, weil es sich erwies, dass dieser Typ teilweise über Einzelmutationen relativ gut verändert werden kann (GUAN *et al.* 2010). Da in dieser Arbeit nicht mit den Typ IIS-Endonucleasen gearbeitet wird, soll auf diese Mutagenesen nicht genauer eingegangen werden.

## 1.7 Vorarbeit zu RM-Systemen aus *Herpetosiphon giganteus*

Im Jahre 1984 konnten KRÖGER *et al.* sieben verschiedene RM-Systeme aus fünf verschiedenen Isolaten von *Herpetosiphon giganteus* (heute auch *Herpetosiphon aurantiacus* genannt) charakterisieren. Die unterschiedlichen Isolate enthielten bis zu drei unterschiedliche RM-Systeme. Sechs der beschriebenen sieben Systeme aus *Herpetosiphon giganteus* konnten von ERDMANN (ERDMANN 1991, ERDMANN *et al.* 1991, ERDMANN *et al.* 1992) und DÜSTERHÖFT *et al.* (1991) kloniert und mindestens teilweise sequenziert werden (vgl. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Genomische Organisation der in *Herpetosiphon giganteus* durch Kröger et al. (1995) charakterisierten RM-Systeme.** Diese Abbildung wurde dort entnommen. Mit einem Kasten markiert sind die in dieser Arbeit bearbeiteten RM-Systeme. Das System *HgiAI* wurde von New England Biolabs kloniert und von der Arbeitsgruppe Kröger sequenziert, ohne das Gen für die Endonuklease manifestieren zu können.

Die in der Arbeit von KRÖGER *et al.* (1984) vorgestellte Hypothese zur Evolution der RM-Systeme aus diesem Frischwasserbakterium geht von einem RM-System aus, das die Sequenz G/GWCC erkennt. Entsprechend der internationalen Nomenklaturregeln werden alle Systeme, die diese Sequenz erkennen, *AvaII*-Systeme genannt. Alle drei *AvaII*-Systeme, die von KRÖGER *et al.* (1984) charakterisiert wurden (RM.*HgiBI*, RM.*HgiCII* und RM.*HgiEI*), gehören dem Typ IIP an. Nach ihren katalytischen Domänen gehören die Restriktionsenzyme dieser RM-Systeme der PD-(D/E)XK-Familie an. Als die drei Systeme RM.*HgiBI*, RM.*HgiCII* und RM.*HgiEI* charakterisiert werden sollten, stellte es sich heraus, dass sie sich ganz unterschiedlich klonieren ließen.

Das System RM.*HgiBI* konnte ohne die sonst übliche Vormethylierung in HB101-Zellen etabliert werden. Die Systeme RM.*HgiEI* und RM.*HgiCII* ließen sich nur in vormethylierten Zellen und nur in Anwesenheit des kleinen Leserahmens OrfC (genannt C.*HgiBI*, C.*HgiEI* oder C.*HgiCII*, vgl.



Der Unterschied in der Klonierung könnte auf unterschiedliche Gründe zurückgeführt werden:

1. Der OrfC hat einen Einfluss auf die Expression von Methyltransferase und/oder Endonuklease.
2. Das RM-System *HgiBI* beinhaltet eine schwache Endonuklease kombiniert mit einer starken Methyltransferase.
3. Die Methyltransferase *M.HgiBI* wird hier als Monomer so ausreichend exprimiert, dass sie es schafft, das gesamte Genom zu methylieren, bevor sich das Dimer der Endonuklease bildet und die zelluläre DNA angreifen kann.

Der erste dieser Punkte sollte von Sabine MEYER-ROGGE (1997) bearbeitet werden. Die Klonierung von *C.HgiCII* gelang jedoch nicht optimal, vermutlich weil die erhöhte Expression von *C.HgiCII* für die Zelle so schädlich ist, dass lediglich geringe Expressionsraten beobachtet werden können. Am Ende lagen zu geringe Proteinkonzentrationen für nachfolgende *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) vor.

Anschließend versuchte Jens KRIESE zu ermitteln (unveröffentlichtes Promotionsprojekt 1996-1999), ob sich die Expression des kleinen Leserahmens *C.HgiCII* auf die Expressionsrate von *R.HgiCII* und/oder *M.HgiCII* auswirkt, wie dies in anderen Systemen gezeigt werden konnte (TAO und BLUMENTHAL, 1992, LUBYS *et al.* 1997). Bei Verwendung von  $\beta$ -Galaktosidase-Assays konnte er aber keinen Unterschied zwischen dem System ohne und mit *C.HgiCII* erkennen. So blieb die Funktion des kleinen Leserahmens weiterhin unklar.

Sequenzvergleiche über BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) boten keinen neuen Anhaltspunkt. Es gibt auch heute in der gesamten Datenbank keinen anderen kleinen Leserahmen, der eine Ähnlichkeit mit *C.HgiCII* (und den beiden anderen) besitzt, lediglich in dem Stamm *Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785, also einem anderen Isolat des gleichen Stammes. Hier ist der entsprechende Leserahmen mit 55 zusätzlichen Aminosäuren annotiert worden. Ansonsten gibt BLAST stets nur Bruchteile von Protein-Sequenzen als Treffer. Es gibt keine Sequenzhomologie zu den oben beschriebenen C-Proteinen aus anderen Systemen. Auffällig ist, dass sich die genomische Organisation von *RM.HgiBI*, *RM.HgiCII* und *RM.HgiEI* deutlich von allen anderen Systemen mit regulatorischen C-Proteinen unterscheidet (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Die erste Vermutung bei der Suche nach dem Grund des unterschiedlichen Verhaltens der drei RM-Systeme führte zu einer intensiven Untersuchung der spezifischen Aktivität der Endonukleasen durch BLUM (1995). Der Austausch einer einzigen Aminosäure an der Position 176 zwischen *R.HgiEI* und *R.HgiBI* führte dazu, dass sich *RM.HgiEI* nun gleichfalls ohne

Vormethylierung klonieren ließ. BLUM überprüfte an diesem Beispiel die zweite oben genannte Hypothese.

Hierzu betrachtete er zunächst die spezifische Aktivität der Wildtypenzyme und führte gezielte Mutagenese an den Genen für die Restriktionsenzyme *R.HgiBI*, *R.HgiCII* und *R.HgiEI* durch.

Hierfür wählte BLUM (1995) zwei Aminosäurepositionen aus, von denen sich eine relativ nahe zum vermuteten aktiven Zentrum befand (Position 176) und eine zweite bei Position 223, die beide beim Sequenzvergleich aufgefallen waren (vgl. Abbildung 8).

BLUM (1995) beobachtete, dass sich die Restriktionsenzyme *R.HgiBI*, *R.HgiCII* und *R.HgiEI* in ihrer spezifischen Aktivität unterscheiden und dass dieser Aktivitätsunterschied auf die beiden oben genannten Aminosäuren zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 9). Er stellte Varianten der drei Endonukleasen her, die sich vom Wildtyp in mindestens einer der zwei Aminosäurepositionen unterschieden und bestimmte dann die spezifische Aktivität nach photographischer Bestimmung der relativen Proteinkonzentrationen.

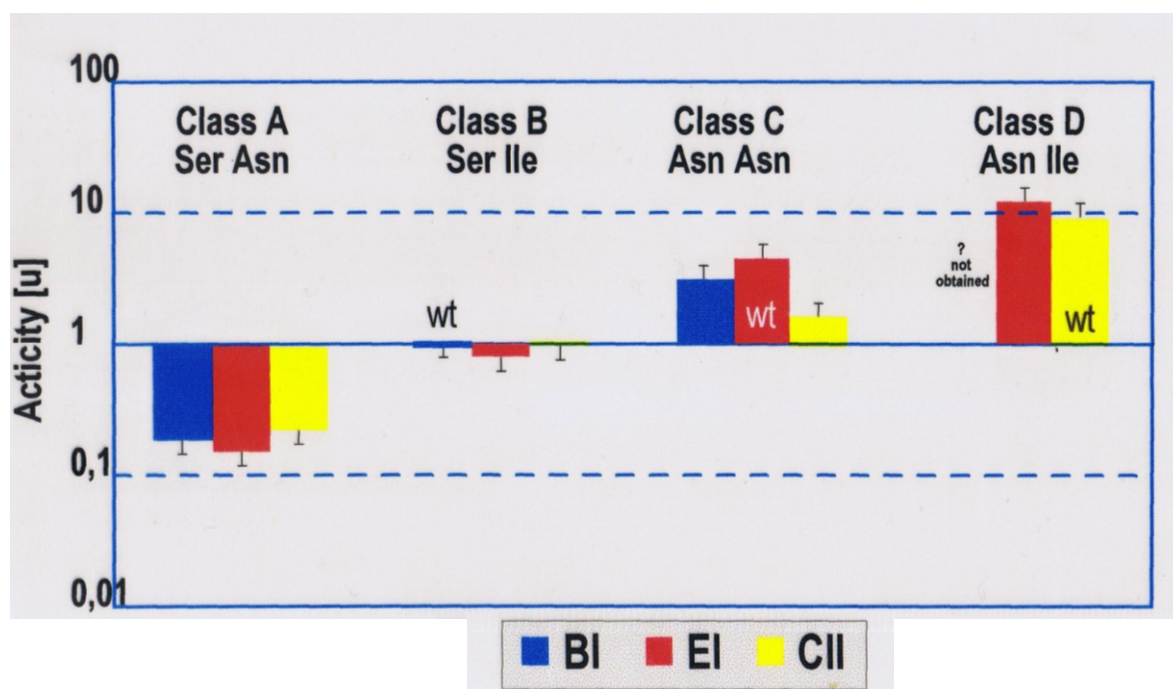


Abbildung 9: Enzymatische Aktivität der durch BLUM erhaltenen Mutanten von *R.HgiBI* (blau), *R.HgiCII* (gelb) und *R.HgiEI* (rot). Als Einheit dienen sogenannte *Units* (Menge an verdauter  $\lambda$ -DNA pro Zeiteinheit), BLUM (1995).

Selbst wenn die gewählte Methode nur semiquantitativ ist, lässt sich so die oben dargestellte Hypothese stützen, dass die Endonuklease *R.HgiBI* eine schwache Endonuklease ist. Deshalb ist es überhaupt möglich, das komplette RM-System *RM.HgiBI* in einem Schritt vormethylierten Zellen zu etablieren. Von 12 theoretisch möglichen Mutanten konnte eine niemals erhalten werden. Es handelte sich um die Mutante *R.HgiBI* S176N, d.h. die Variante, die in ihren beiden Aminosäuren an der Position 176 und 223 mit *R.HgiCII* identisch war. Die Konstruktion wurde



von Jens KRIESE (1996, unveröffentlichtes Promotionsprojekt 1996-1999) erneut versucht. Auch KRIESE konnte diese Mutation nicht herstellen. Für diesen Misserfolg kann es zwei Gründe geben:

1. Die spezifische Aktivität der entstehenden Endonuklease ist zu hoch, um von einer unveränderten *M.HgiBI* kontrolliert zu werden. Die Wirtszelle kann deswegen nicht durch die Methylierung von wildtypischer *M.HgiBI* geschützt werden und stirbt ab.
2. Die entstehende Endonuklease könnte eine Nebenaktivität erwerben, die durch die wildtypische *M.HgiBI* nicht abgedeckt werden kann.

Jens KRIESE führte weitere Versuche durch und ermittelte, dass *R.HgiBI* eine zusätzliche Spezifität besitzt. Er konnte die genaue Sequenz dieser Spezifität nicht ermitteln. Zusätzlich konnte er die bis dato bekannten sechs Sequenzabweichungen zwischen *R.HgiBI* und *R.HgiEI* auf drei reduzieren (Positionen 119, 176 und 223), bei den drei anderen handelte es sich um bis dato unentdeckte Sequenzierfehler.

## **1.8 Eigene Vorarbeiten**

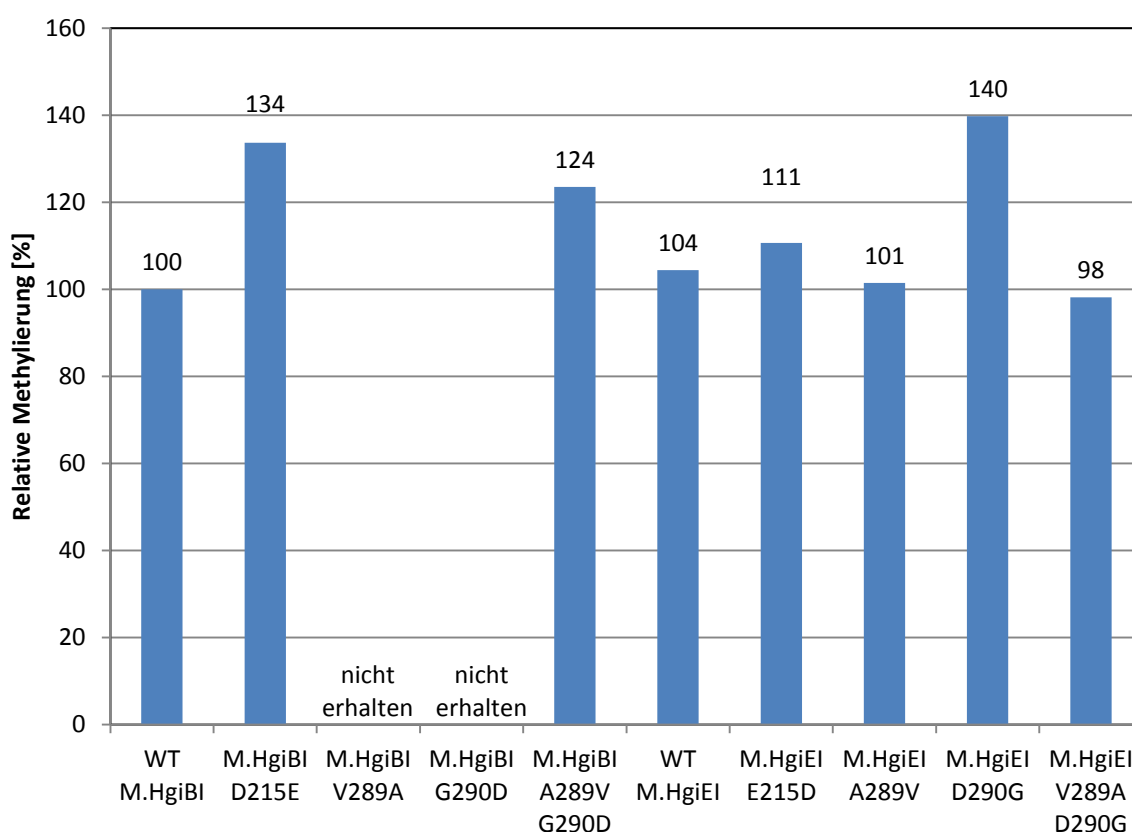
Keine der bisher hier vorgestellten Arbeiten aus dem Arbeitskreis KRÖGER hatte die Rolle der Methyltransferasen berücksichtigt. Dies wurde erst in der Diplomarbeit der Verfasserin thematisiert. Wie die Gruppe der *Hgi*-Restriktionsenzyme zeigt auch die Gruppe der zugehörigen Methyltransferasen eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander. Sie ist zwischen *M.HgiEI* und *M.HgiBI* größer, als zwischen *M.HgiCII* und *M.HgiEI* bzw. *M.HgiBI* (vgl. Abbildung 10).

MHgiBI	MQQFRFIDLFAGIGGFRLLGLEAVGGVCVSAEIDQQAIKVYRQNWPTDGVVDHNLGDITAI	60
MHgiEI	MQQFRFIDLFAGIGGFRLLGLEAVGGVCVSAEIDQQAIKVYRQNWPTDGVVDHNLGDITAI	60
MHgiCII	MQQFRFIDLFAGIGGFRLLGLEAVGGICVCSAEIDQQAIKVYRQNWPTDRSEHNLGDITTL	60
	*:*****:*.*****:*****:*****:*****:	
	-----BlockI-----      -----Block II---	-III-
MHgiBI	QQLPAHDVIVGGVPCQPWSIAGKNQAFDDPRGQLWADVIRLVQINQPKAFIFENVKGLVD	120
MHgiEI	QQLPAHDVIVGGVPCQPWSIAGKNQAFDDPRGQLWADVIRLVQINQPKAFIFENVKGLVD	120
MHgiCII	QQLPAHDVIVGGVPCQPWSIAGKNQAFDDPRGQLWADVIRLVQINQPKAFIFENVKGLVD	120
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
	--- Block IV-----      - Block V-      -----Block VI---	
MHgiBI	PRNRLCLEIILDSFKDLGYSVIFYKLLNSFDFGVAQNRDRVFIVGIQKKLNLNGFSFPEYT	180
MHgiEI	PRNRLCLEIILDSFKDLGYSVIFYKLLNSFDFGVAQNRDRVFIVGIQKKLNLNGFSFPEYA	180
MHgiCII	PRNRLCLESILDSFKAEGYNVIFYKLLNSFDFGVAQNRDRVFIVGIQKKLGVPDFSFPEYS	180
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
	----- -VII- ----- Block VIII-----	
MHgiBI	ESEQRLYHILDNLEVPETKLESIPQIRNLFGERIDVGYNKLTTPRGAFNDFFILNDIRNGP	240
MHgiEI	ESDQRLYHILDNLEAPETKLESIPQIRNLFGERIEVGYNKLTTPRGAFNDFFILNDIRNGP	240
MHgiCII	ESEQRLYHILDNLOTPSIIPESLPQIRNLFGERIEVGYNKLTTPRGAFNDFFILNDIRNGP	240
	**:	
MHgiBI	TSIHSWEIYPTTEREKICMTIMNRNNSRYGDCDGNPMSYCDIAELVAGLAELQTLV	300
MHgiEI	TSIHSWEIYPTTEREKICMTIMNRNNSRYGDCDGNPMSYCDIAELVVDLAENELQILV	300
MHgiCII	TSIHSWEIYPTTEREKICMTIMNRNNSRYGDCDGNPMSYCDIADLVVDLAELQVLI	300
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
MHgiBI	EKRILRQYEDGKYEFFNRRLSGGIDGTYRIFLPNARFFGTLTARGMHDEIAEISVSGANA	360
MHgiEI	EKRILRQYEDGKYEFFNRRLSGGIDGTYRIFLPNARFFGTLTARGMHDEIAEINVSGANA	360
MHgiCII	EKRILRQYEDGKYEFFNRRLSGGIDGTYRIFLPNARFFGTLTARGMHDEIAEISVSGATA	360
	:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
MHgiBI	EYKHNFIQQVLPKRYRKITVSEAAARLQGFPGSFQFHSNQSANFRLIGNSVAPPVIVAL	420
MHgiEI	EYKHNFIQQVLPKRYRKITVSEAAARLQGFPGSFQFHSNQSANFRLIGNSVAPPVIVAL	420
MHgiCII	EYKHNFIQQVLPKRYRKITVSEAAARLQGFPGSFQFHSNQSANFRLIGNSVAPPVIVAL	420
	**:	
	---- Block IX-----/-----Block X-----	
MHgiBI	GKALQCVKLFEEELCEV	437
MHgiEI	GKRLQCVKLFEEELCEV	437
MHgiCII	GKALPNDHLFEELCEV	437
	** * :*** *****	
	----	

**Abbildung 10: Vergleich der Primer-Sequenzen der verwandten Methyltransferasen M.HgiBI, M.HgiEI und M.HgiCII.** Dieser Vergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) erstellt. Rot markiert sind die Positionen, an denen M.HgiBI und M.HgiCII übereinstimmen, blau markiert sind die Positionen, an denen alle drei Methyltransferasen eine andere Aminosäure besitzen. Grün markiert sind solche Positionen, an denen nur M.HgiEI und M.HgiBI identisch sind, gelb markiert sind Positionen, an denen nur M.HgiEI und M.HgiCII identisch sind. Die Blöcke I bis X kennzeichnen die in C5-Methyltransferasen konservierten Motiv-Blöcke (bei PÓSFAL *et al.* (1989) postuliert, für M.HgiBI, M.HgiEI und M.HgiCII von ERDMANN (1992) ermittelt)

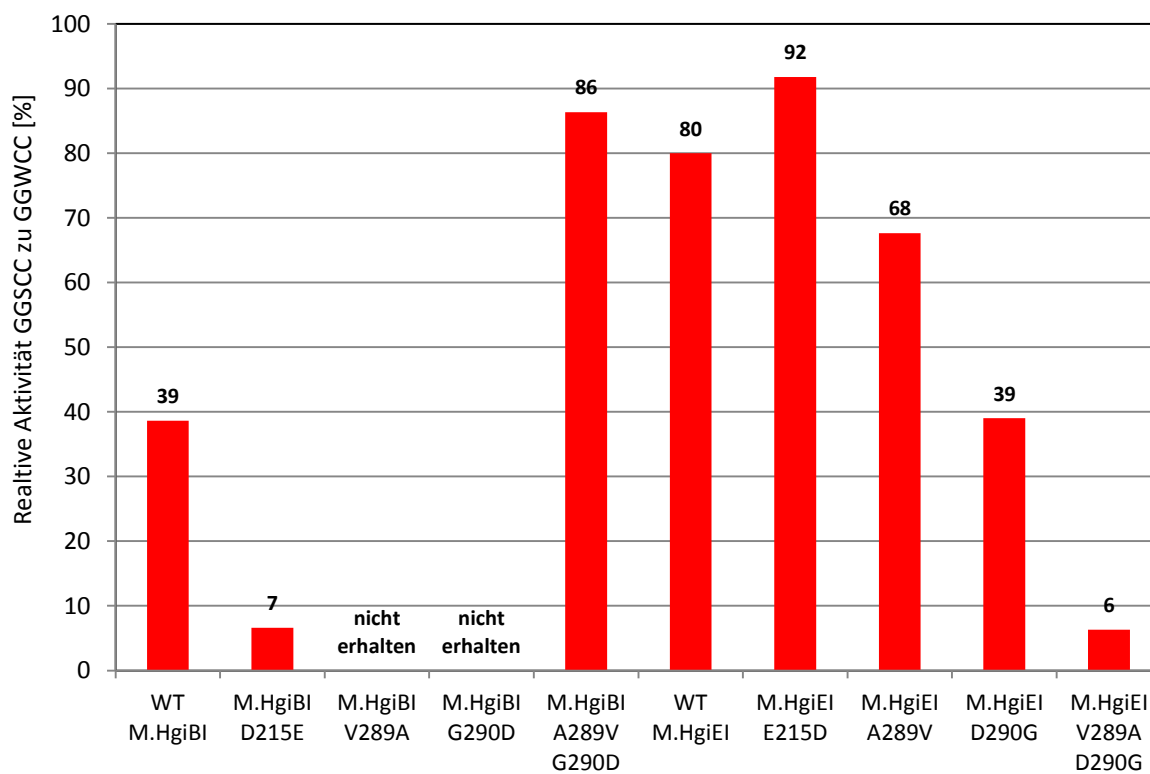
Bei einer genauen Betrachtung der Spezifität der Methyltransferasen wurde deutlich, dass M.HgiBI und M.HgiEI zusätzlich zu der bekannten *AvaII*-Methylierungssequenz GGWCmC (wobei mC das methylierte Cytosin kennzeichnet) eine weitere Sequenz methylieren konnten, und zwar GGSCmC. Diese Spezifität wurde zusammen mit der ursprünglichen Spezifität als GGNCC zusammengefasst. Sie war bereits früher als *Sau96I*-Spezifität bekannt. Ähnliche Beobachtungen konnten TIMÁR *et al.* (2004) für das *AvaII*-Isoschizomer System RM.*SinI* berichten.

In der genannten Diplomarbeit sollte überprüft werden, ob die Methylierung an der Sequenz *Sau96I* mit derselben Effizienz erfolgt, wie die Methylierung an der Haupterkennungssequenz *AvaII*. Dies wurde mit wildtypischen Methyltransferasen durchgeführt. Zusätzlich wurden Mutanten hergestellt, um zu überprüfen, ob die ausgewählten Aminosäurepositionen einen Beitrag zu der Methylierungsaktivität leisten. Es wurden drei Positionen aus der postulierten *target recognition domain* (auch TRD genannt) der Methyltransferase ausgewählt. Es stellte sich heraus, dass es entgegen der Erwartungen keinen Unterschied in der Methylierung der Sequenz GGWCC zwischen *M.HgiBI* WT und *M.HgiEI* WT gibt (vgl. Abbildung 11). Dieses Ergebnis war überraschend, weil die Endonuklease *R.HgiEI* eine stärkere spezifische Aktivität im Vergleich mit *R.HgiBI* besitzt. Erwartet wurde, dass *M.HgiEI* eine stärkere Aktivität hat, um die stärkere Endonuklease zu kontrollieren.



**Abbildung 11: Darstellung der relativen Aktivität verschiedener Methyltransferasen an der Erkennungsstelle GGWCC.** Die Methylierungsaktivität von *M.HgiBI* WT wurde als 100% gesetzt (Daten aus der Diplomarbeit von Falgenhauer (2008))

Bei der spezifischen Aktivität an der Erkennungssequenz GGSCC zeigte sich, dass bei dem wildtypischen Enzym *M.HgiBI* die Aktivität niedriger war, als bei dem wildtypischen Enzym *M.HgiEI* (vgl. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Darstellung der relativen Aktivität verschiedener Methyltransferasen aus der Diplomarbeit an der Sequenz GGSCC.** Die Aktivität wurde verglichen mit der Aktivität an der Erkennungssequenz GGWCC, jeweils mit dem gleichen Methyltransferase-Typ (Daten aus der Diplomarbeit von Falgenhauer (2008)).

## 1.9 Zielsetzung

Die Ergebnisse aus der Diplomarbeit waren in verschiedenen Fällen nicht reproduzierbar. Es musste festgestellt werden, dass der verwendete Klon für *M.HgiEI* eine Abweichung zu der ursprünglichen bestimmten Sequenz aufwies (Position 35, Mutation Q→P). Somit dürfen die oben in Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse (für *M.HgiEI*) nur als relativ gesehen werden. Sie sollen in dieser Arbeit wiederholt werden.

Außerdem soll die bisher unberücksichtigte Methyltransferase *M.HgiCII* in die Betrachtung der Methylierungsaktivität einbezogen werden. Es gilt folgende Hypothesen zu prüfen:

1. Die bisherigen Ergebnisse haben ein interessantes Phänomen aufgedeckt, das aber noch nicht vollständig reproduzierbar gelingt.
2. Zellphysiologie und zusätzliche Faktoren sind noch nicht in die Untersuchung einbezogen.
3. Das dritte RM-System *RM.HgiCII* könnte für die Erklärung der Unterschiede in der Klonierbarkeit hilfreiche Hinweise liefern.
4. Durch systematische Veränderung der einzelnen Aminosäure-Positionen soll es gelingen, die Unterschiede in der Klonierbarkeit und in der DNA-Sequenzerkennung auf einzelne Aminosäurepositionen zurückzuführen.

Um diese vier Annahmen zu stützen, sollen prinzipiell alle Konstrukte auf der Basis einheitlicher Plasmidvektoren neu aufgebaut und komplett neu charakterisiert werden. Die neuen Plasmidvektoren sollen so aufgebaut sein, dass keine unnötigen DNA-Abschnitte die Ergebnisse beeinflussen können.

Auf diese Art und Weise sollte es gelingen, drei Positionen in den verschiedenen Endonukleasen und drei Positionen in den zugehörigen Methyltransferasen systematisch zu untersuchen. So sollte es vor allem auch gelingen, die durch Jens KRIESE (unpubl.) beobachtete zusätzliche Spezifität von *R.HgiBI* weiter zu bearbeiten und einzugrenzen. Hierzu muss eine neue Methode entwickelt werden, um dies schnell und einfach klären zu können. Zusätzlich zu *R.HgiBI* WT sollen verschiedene Mutanten von *R.HgiBI*, *R.HgiEI* und *R.HgiCII* auf eine zusätzliche Spezifität überprüft werden, da es nicht auszuschließen ist, dass das Problem der Klonierung der S176N Variante von *R.HgiBI* darauf beruht, dass die gebildete Mutante eine zusätzliche, von der Methyltransferase nicht abgedeckte Spezifität zeigt.

## 2 Material

### 2.1 Enzyme

Die Enzyme wurden bis auf eine Ausnahme von kommerziellen Herstellern bezogen. Die einzelnen verwendeten Typen werden im Weiteren aufgeführt.

#### 2.1.1 Restriktionsenzyme

Bis auf die selbst isolierten Enzyme *R.HgiBI*, *R.HgiEI* und *R.HgiCII* (Wildtyp und Mutanten) wurden alle Restriktionsenzyme entweder über NEB (Bad Schwalbach) oder Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Bei der weiteren Darstellung der kommerziellen Restriktionsenzyme wird auf das Präfix *R.* verzichtet (d.h. z.B. *Sau96I* statt *R.Sau96I*). Bei einigen Enzymen wird statt dem tatsächlichen Namen der Name des Isoschizomere verwendet (*Sau96I*= *Cfr13I* von Fermentas, *AvaII*= *Eco47I* von Fermentas).

#### 2.1.2 DNA-Polymerase für PCR

<i>Tfl</i> -Polymerase	Epicentre (über Biozym, Hessisch Oldendorf)
------------------------	---

#### 2.1.3 DNA-Modifizierende Enzyme

T4-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Klenow-Fragment	Fermentas (St. Leon-Rot), Stratagene (Heidelberg)

#### 2.1.4 Andere Enzyme

RNase A	Qiagen (Hilden)
---------	-----------------

### 2.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den kommerziellen Anbietern Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Aldrich-Chemie (Steinheim), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Fluka (Buchs) bezogen.

## 2.3 Nährmedien

### 2.3.1 LB-Medium

(Vollmedium nach LURIA und BERTANI, autoklaviert)

Natriumchlorid (10g/l)

Pepton (10g/l)

Hefeextrakt (5g/l)

Für Agar-Platten werden vor dem Autoklavieren 15g Agar-Agar pro Liter hinzugegeben. Die Menge ist ausreichend für 40 Agarplatten á 25ml.

### 2.3.2 Selektive Medien

Für selektive Medien wurden folgende Antibiotika benutzt. Die verwendete Endkonzentration in LB-Medium ist in der Klammer angegeben.

Ampicillin

100mg/ml Stocklösung Ampicillin in HPLC-H<sub>2</sub>O (100µg/ml Endkonzentration)

Tetrazyklin

10mg/ml Stocklösung in 70% Ethanol (10µg/ml Endkonzentration)

Chloramphenicol

17mg/ml Stocklösung in 70% Ethanol (34µg/ml Endkonzentration)

### 2.3.3 Blau-Weiß-Selektion/GFP-Expression

Für die Blau-Weiß-Selektion und Expression des GFP-Gens (siehe Abschnitt 4.5.2) wurden IPTG, Xgal und das benötigte Antibiotikum zum LB-Medium hinzugefügt.

IPTG

20mg/ml Stocklösung in ddH<sub>2</sub>O (10µg/ml Endkonzentration, entspricht 42µM)

Xgal

20mg/ml Stocklösung in 70% Ethanol (40µg/ml Endkonzentration)

### 2.3.4 Induktionsmedium

Um Methyltransferasen bzw. Restriktionsenzyme zu exprimieren, wurden die Zellen mit 1M IPTG-Lösung versetzt, wobei die Endkonzentration bei Methyltransferasen bei 1mM IPTG lag (entspricht 238µg/ml), bei Restriktionsenzymen bei 0,8mM IPTG (190µg/ml). Die 1M IPTG-Lösung wurde in ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

## 2.4 Puffer und Lösungen

Die Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit Reinstwasser angesetzt. Das Reinstwasser wurde für mikrobielle Versuche autoklaviert.

### 2.4.1 Puffer Bisulfit-Reaktion

10M Ammoniumacetat

2.3M Bisulfit-Lösung (Natriumpyrosulfit, versetzt mit 10M NaOH, Endkonzentration 0,4M)

10mM Hydrochinon-Lösung

10M NaOH-Lösung

1M NaOH-Lösung

### 2.4.2 DNA- Elektrophorese-Puffer

TBE-Laufpuffer:

0,089M Borsäure

0,089M Tris

2mM Na<sub>2</sub>EDTA (mit NaOH eingestellt auf pH8,0)

Auftragspuffer für DNA (6x):

50% (v/v) Glycerin

50mM Na<sub>2</sub>EDTA (mit NaOH eingestellt auf pH8,0)

0,1M Tris (mit HCl eingestellt auf pH 8,0)

Bromphenolblau 0,1% (w/v)

Dieser Puffer wurde in autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

Ethidiumbromid-Färbelösung für Agarosegele

1,6g/l Ethidiumbromid (Stocklösung 10g/l)

Zugabe der Ethidiumbromid-Lösung zu Reinstwasser ergibt die Färbelösung.

### 2.4.3 Puffer für Plasmid-Isolierung

Lösung P1:

50mM Tris (mit HCl eingestellt auf pH8,0)

10mM Na<sub>2</sub>EDTA (mit NaOH eingestellt auf pH8,0)

Lösung autoklavieren, vor dem Benutzen mit 100µg/ml RNase A versetzen, im Kühlschrank aufbewahren.



Lösung P2:

200mM NaOH

1% (w/v) SDS

Lösung P3:

3M Kaliumacetat pH 5,5

**2.4.4 Puffer für Proteinaufreinigung**

Bei der Herstellung der Puffer für die Aufreinigung der Endonukleasen bzw. Methyltransferasen wurde zunächst ein Basispuffer erstellt, welcher dann mit weiteren Komponenten versetzt wurde. Alle Puffer bis auf den Basis-Puffer wurden bei 4°C gelagert.

**2.4.4.1 Puffer für Aufreinigung von Endonukleasen**Basispuffer (5x)

250mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,5M	NaCl
10mM	β-Mercaptoethanol
125mM	Imidazol
	➔ mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

2,5M Imidazol-Lösung

ohne pH-Einstellung

Lysepuffer

1x	Basispuffer
5% (v/v)	Glycerin
8mM	β-Mercaptoethanol

Waschpuffer 1

1x	Basispuffer
8% (v/v)	Glycerin
5mM	β-Mercaptoethanol
12,5mM	Imidazol (hierfür die 2,5M ImidazolLösung verwenden)

Waschpuffer 2

1x	Basispuffer
25mM	Imidazol (hierfür die 2,5M ImidazolLösung verwenden)

Elutionspuffer 1

1x	Basispuffer
100mM	Imidazol (hierfür die 2,5M ImidazolLösung verwenden)

Elutionspuffer 2

1x	Basispuffer
600mM	Imidazol (hierfür die 2,5M ImidazolLösung verwenden)

### 2.4.4.2 Puffer für die Aufreinigung von Methyltransferasen

#### Basispuffer 5x

250mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,5M	NaCl

→ pH uneingestellt lassen.

#### 1M Imidazollösung

mit HCl auf pH8,0 einstellen

#### Lysepuffer

1x	Basispuffer
5% (v/v)	Glycerin
10mM	β-Mercaptoethanol

→ Puffer mit NaOH auf pH8,0 einstellen

#### Waschpuffer 1

1x	Basispuffer
8% (v/v)	Glycerin
7mM	β-Mercaptoethanol
5mM	Imidazol (hierfür die 1M Imidazollösung, pH8,0 verwenden!)

→ Puffer mit NaOH auf pH8,0 einstellen

#### Waschpuffer 2

1x	Basispuffer
2mM	β-Mercaptoethanol
10mM	Imidazol (hierfür die 1M Imidazollösung, pH8,0 verwenden!)

→ Puffer mit NaOH auf pH8,0 einstellen

#### Elutionspuffer 1

1x	Basispuffer
2mM	β-Mercaptoethanol
40mM	Imidazol (hierfür die 1M Imidazollösung, pH8,0 verwenden!)

→ Puffer mit NaOH auf pH8,0 einstellen

#### Elutionspuffer 2

1x	Basispuffer
240mM	Imidazol (hierfür die 1M Imidazollösung, pH8,0 verwenden!)

→ Puffer mit NaOH auf pH8,0 einstellen

### 2.4.5 Puffer für SDS-PAGE

#### Trenngelpuffer (4x)

1,5M Tris

Mit konzentrierter auf pH8,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C.

Sammelgelpuffer (4x)

0,5M Tris

Mit konzentrierter HCl auf pH6,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C.

10% APS-Lösung

10% (w/v) APS

In autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O lösen, bei 4°C aufbewahren. Die Lösung sollte nicht länger als einen Monat nach Herstellung verwendet werden.

5x SDS-Probenpuffer

10% (v/v)	Glycerin
2% (w/v)	SDS
0,5x	Sammelgelpuffer (s.o.)
100mM	β-Mercaptoethanol
0,1g/l	Bromphenolblau

Die Lösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und bei RT gelagert. Die entsprechenden Proben wurden trotz der 5x Konzentration des SDS-Probenpuffers nur im Verhältnis 1:1 damit versetzt (besseres Einsinken der Probe in die Auftragsaschen).

SDS-PAGE-Laufpuffer (5x)

15g/l	Tris
5g/l	SDS
72g/l	Glycin

In Reinstwasser lösen, bei Raumtemperatur aufbewahren. Bei Bedarf 1:5 verdünnen und mindestens dreimal wiederbenutzen.

Färbelösung für SDS-Gele (COOMASSIE-Blue)

25% (v/v)	Isopropanol
10% (v/v)	Essigsäure
0,4g/l	Brilliant Blau R 250

Mit Wasser auffüllen und vor dem ersten Benutzen über einen Faltenfilter filtrieren, mehrmals verwenden.

Entfärbelösung für SDS-Gele

25% (v/v)	Isopropanol
10% (v/v)	Essigsäure

Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist im Methodenteil zu finden!

## 2.5 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 1 dargestellt. SURE<sup>®</sup> und XL1blue-MRF<sup>+</sup>-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. W. WENDE (Institut für Biochemie FB08, JLU Giessen) zur Verfügung gestellt. Alle anderen Stämme wurden der Stammsammlung des Institutes für Mikro-und Molekularbiologie entnommen.

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Bakterienstämme.**

E.coli-Stamm	Genotyp	Natürliche Resistenz
SURE <sup>®</sup> (Stratagene)	<i>e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Kanamycin Tetrazyklin Nalidixinsäure Chloramphenicol in geringen Konzentrationen
XL1-blue MRF <sup>+</sup> (Stratagene)	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Tetrazyklin Nalidixinsäure Chloramphenicol in geringen Konzentrationen
BL21 (DE3) [weiter nur als BL21 bezeichnet]	<i>F<sup>-</sup>, ompT, hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm, λDE3(lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5)</i>	Laut Novagen: keine Resistenz
HB101	<i>F<sup>-</sup> mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm<sup>R</sup>) glnV44 λ<sup>-</sup></i>	Streptomycin

## 2.6 Ausgangsplasmide

In Tabelle 2 sind die verwendeten Ausgangsplasmide angegeben. Der Vektor pBluescript II SK+ ist weiter als „pBSSK+“ geführt.

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Ausgangsplasmide.**

Plasmid <sup>a</sup>	Eigenschaften <sup>b</sup>	Abbildung	Herkunft
pQE30	<i>amp<sup>R</sup></i>	Kommerziell	STRATAGENE
pBluescript II SK+	<i>amp<sup>R</sup></i>	Kommerziell	STRATAGENE
pBCSK+	<i>cam<sup>R</sup></i>	kommerziell	STRATAGENE
pHK662	<i>hgiCII</i> Fr. <i>P<sub>HgiCIIM</sub></i> , <i>hgiCIIM</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>tet<sup>R</sup></i>	Abbildung 35	ERDMANN (1992)
pKW3	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>gfp</i> , <i>lacZ<sup>o</sup></i> <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>rrnB</i>	Abbildung 73	KRÖGER & BARTH-WEBER (NICHT PUBLIZIERT)
pKW6	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>amp<sup>R</sup></i> , <i>rrnB</i>	Abbildung 52	KRÖGER & BARTH-WEBER (NICHT PUBLIZIERT)
pBIM-5 und Mutanten davon	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>hgiBIM*</i> , <i>amp<sup>R</sup></i>	Abbildung 18	FALGENHAUER (2008)
pCIIM-5	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>hgiCIIM*</i> <i>amp<sup>R</sup></i>	Abbildung 66	RICHTER (2008)
pEIM-5 und Mutanten davon	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>hgiEIM*</i> <i>amp<sup>R</sup></i>	Abbildung 21	FALGENHAUER (2008)
pBI-His und Mutanten davon	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>hgiBIM</i> ( <i>LacZ<sub>α</sub></i> -Fusion), <i>P<sub>HgiR</sub></i> , <i>hgiBIR</i> -His <sub>6</sub> , <i>amp<sup>R</sup></i>	Abbildung 24	BLUM (1995)
pEI-His und Mutanten davon	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>hgiEIC</i> ( <i>LacZ<sub>α</sub></i> -Fusion), <i>P<sub>HgiM</sub></i> <i>hgiEIM</i> , <i>P<sub>HgiR</sub></i> , <i>hgiEIR</i> -His <sub>6</sub> , <i>amp<sup>R</sup></i>	Abbildung 53	BLUM (1995)
pEI-His NI	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>hgiEIC</i> ( <i>LacZ<sub>α</sub></i> -Fusion), <i>P<sub>HgiM</sub></i> , <i>hgiEIM</i> , <i>P<sub>HgiR</sub></i> , <i>hgiEIR</i> -His <sub>6</sub> , <i>amp<sup>R</sup></i>	Abbildung 24	BLUM (1995)
pCII-His	<i>P<sub>lac</sub></i> , <i>hgiCII</i> <sup>o</sup> , <i>P<sub>HgiM</sub></i> <i>hgiCIIM</i> , <i>P<sub>HgiR</sub></i> , <i>hgiCIIR</i> -His <sub>6</sub> , <i>amp<sup>R</sup></i>	Abbildung 54	BLUM (1995)

<sup>o</sup> nicht exprimiertes Gen, aber auf Plasmid kodiert

\*= Methyltransferase als „Direkt-Stopp-Konstrukt“ an *LacZ<sub>α</sub>* angehängt (vgl. Tabelle 17).

<sup>a</sup> Alle Plasmide nutzen als Vektor pBR328 bzw. pUC19 (YANISCH-PERRON *et al.* 1985).

<sup>b</sup> His<sub>6</sub> bedeutet, dass das zu exprimierende Protein C-terminal eine Hexa-Histidin-Sequenz besitzt.

## 2.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden als Oligodesoxyribonukleotide von der Firma Biomers (Ulm) bezogen. Sie wurden lyophilisiert geliefert und mit soviel ddH<sub>2</sub>O gelöst, dass eine Konzentration von 100pM erreicht wurde. In der PCR wurde standardmäßig eine 10pM Lösung verwendet. Die Schmelztemperatur wurde nach dem zum Gen komplementären Anteil berechnet und kann deshalb von der zu erwartenden Schmelztemperatur abweichen.

In der Tabelle 3 sind die Oligonukleotide für die Amplifikation der Methyltransferasen *M.HgiBI*/ *M.HgiEI*/ *M.HgiEI*-Gene als ATGA-Konstrukt dargestellt.

**Tabelle 3: Oligonukleotide für die Amplifizierung der *M.HgiBI*/ *M.HgiEI*/ *M.HgiEI* –Gene in der ATGA Anhängung.** Dick gedruckt sind die eingeführten Schnittstellen.

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Besonderheit	Verwendung
BEILINK 4	5'- <b>GCCGGTACCGGGAAGACA</b> ATTATGAAACAATTTCGC-3'	<i>forward</i>	<i>KpnI</i> -Linker	Amplifikation <i>M.HgiBI</i> / <i>M.HgiEI</i> als ATGA- Konstrukt
BEILINKC	5'-CGGCTGCAGCTAAA CCTCACACAACCTCTTG-3'	<i>reverse</i>	<i>PstI</i> -Linker	Gegenprimer zu BEILINK 4
ATGA- neu09	5'- <b>CGCGGTACCTGAAAGTCAG</b> CTATGAAACAATTTCGG –3'	<i>forward</i>	<i>KpnI</i> -Linker	Amplifikation <i>M.HgiCII</i> als ATGA Konstrukt
C2-gegen	5'-CGCCTGCAGTTAAACCT CACACAATTCAGGCTC-3'	<i>reverse</i>	<i>PstI</i> -Linker	Gegenprimer zu ATGA-neu09

In Tabelle 4 sind die Oligonukleotide für die Amplifikation der *dcm* bzw. *vsr* –Gene aus dem Genom von *E.coli* SURE<sup>®</sup> dargestellt.

**Tabelle 4: Oligonukleotide für die Amplifizierung der *dcm* bzw. *vsr* –Gene.** Dick gedruckt ist die eingeführte Schnittstelle.

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Verwendung
Dcm vorne	5'-CGCC <b>GGTACCT</b> GTC GGCCATCTCAG-3'	forward	Amplifikation von <i>dcm</i>
Dcm hinten	5'-GGCCTGCAGTTATC GTGAACGTCGGCC-3'	reverse	Gegenprimer von Dcm vorne
Vsr vorne	5'-CGCC <b>GGTACCGG</b> TCT TTTGCCGCGG-3'	forward	Amplifikation von <i>vsr</i> Position für Primer liegt ca. 100bp vor Beginn des Start-Codons für <i>vsr</i>
Vsr hinten	5'- GGCCTGCAGTCAAGC GAGTAAATGAATCC-3'	reverse	Amplifikation von <i>vsr</i> , Gegenprimer von <i>vsr</i> vorne oder Dcm vorne

In Tabelle 5 sind die Oligonukleotide aufgeführt, welche für die Mutagenese der Methyltransferasen verwendet worden sind.

**Tabelle 5: Oligonukleotide für die Mutagenese der Methyltransferase M·HgiEI an den Positionen 215, 289 und/oder 290**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Verwendung
EI215BIR	5'-ACCAACATCAATCCGTTCCACC-3'	<i>reverse</i>	Mutagenese M·HgiEI an der Position 215
EI215BIF	5'-TATAATAAATTAACCTCTCGTGG-3'	<i>forward</i>	Mutagenese M·HgiEI/ M·HgiBI an der Position 215
EI290BIR	5'-CTAAACCAACAATAATTCAGC-3'	<i>reverse</i>	Mutagenese M·HgiEI an der Position 290
EI289BIF	5'-CTGAAAATGAATTACAAATTTAG-3'	<i>forward</i>	Mutagenese M·HgiEI an der Position 289/290

In Tabelle 6 sind die Oligonukleotide aufgeführt, welche für die Mutagenese von R·HgiBI verwendet worden sind.

**Tabelle 6: Oligonukleotide für die Mutagenese von R·HgiBI an den Positionen 119 und 176.**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Verwendung
RB119EM	5'-TCATTGATCGTGGT CTGAAGCACC-3'	<i>reverse</i>	Mutagenese an Position 119 → R·HgiEI
RB119CM	5'-ATATTGATCGTGGT CTGAAGCACC-3'	<i>reverse</i>	Mutagenese an Position 119 → R·HgiCII
RB119EG	5'-TAGAAATTAATTGA TCAATTGCTGCCC-3'	<i>forward</i>	Gegenprimer zu RB119EM/CM
Richtig709	5'-GGCCTTTATTAGGT TTTGGCG-3'	<i>reverse</i>	Mutagenese an Position 176 → R·HgiCII
RB176CIIF	5'-AATGCCTTGAGGT TATGCAACG-3'	<i>forward</i>	Gegenprimer zu richtig709

Um die Nebenaktivität der Endonukleasen zu ermitteln, wurden die in Abschnitt 4.5.2 dargestellten Methoden verwendet. Die hierfür benötigten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Oligonukleotide für die Bestimmung der Nebenaktivität der Endonukleasen**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Verwendung
E-eins-FW	5'-GGTTATTGTCTC ATGAGCGG-3'	<i>forward</i>	Amplifikation eines 439bp großen Fragmentes aus pBSSK+ für Nebenaktivität Endonukleasen
E-eins-RV;	5'-CTTTCGCTTTCT TCCCTTCC-3'	<i>reverse</i>	Amplifikation eines 439bp großen Fragmentes aus pBSSK+ für Nebenaktivität Endonukleasen
startGFP2	5'-GAATTGGGACA ACTCCAGTG- 3'	<i>forward</i>	Bestimmung der Erkennungssequenz der Nebenaktivität der Endonukleasen
GFPstop	5'-GGGATTACACAT GGCATGG-3'	<i>reverse</i>	Bestimmung der Erkennungssequenz der Nebenaktivität der Endonukleasen

Die Methylierungsaktivität von Methyltransferasen wurde zunächst nach der in der eigenen Diplomarbeit verwendeten Methode durchgeführt. Die Überprüfung der Methylierungsaktivität erfolgt durch die sogenannte Bisulfit-Methode (FROMMER *et al.* 1992). Nach der Bisulfit-Behandlung wurde zunächst ein ca. 300bp großes Fragment aus dem Ampicillinresistenz-Gen der jeweiligen für die Methyltransferasen kodierenden Plasmide amplifiziert, welches zwei *AvaII*-Schnittstellen (natürliche Aktivität von *M.HgiEI*, *M.HgiBI* und *M.HgiCII*) und eine GGSCC-Erkennungssequenz (Nebenaktivität der Mutante) aufwies. Die für die Amplifikation und darauffolgende Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Darstellung der Oligonukleotide für die Methylierungsanalyse der Methyltransferasen *M.HgiCII*, *M.HgiBI* und *M.HgiEI*.**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Eigenschaften bei Sequenzierung
A1	5'-TAATAAATTA GTTAGTTGGAAG-3	<i>forward</i>	<i>AvaII</i> gut abgedeckt, GGSCC nicht sichtbar
B1	5'-TAACACTACA ACCAACTTAC-3'	<i>reverse</i>	<i>AvaII</i> und GGSCC gut sichtbar

Die in Tabelle 8 gelisteten Oligonukleotide reichten allerdings nicht aus, um eine genauere Aussage über mögliche zusätzliche Spezifitäten außer der Methylierung der Sequenz GGSCC zu treffen. Deshalb wurden direkt in die Plasmide, welche für die einzelnen Methyltransferasen kodierten, zwei Linker mit verschiedenen möglichen Sequenzen für zusätzliche Spezifitäten eingefügt. Diese wurden aus jeweils zwei Oligonukleotiden hybridisiert. Diese sind in Tabelle 9



aufgeführt (ursprüngliche Quelle der Plasmide: eigene Diplomarbeit bzw. Masterarbeit von Denis RICHTER (2008))

**Tabelle 9: Oligonukleotide zur Herstellung der Linker für die Bestimmung einer zusätzlichen Spezifität der Methyltransferasen**

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Meth-Bam1	5'-GGACCATGGGCCGAACCGCACCG TACCGGATCCGCTCCGTTCCGG-3'	Primer ergeben hybridisiert den „BamHI-Linker“
Meth-Bam2	5'-CGCCGGAACGGAGCGGATCCGGTAC GGTGCGGTTCCGGCCCATGGTCCTGCA-3'	
Meth-Xba1	5'-GGACCATGGGCCCCGACCCGTCCTCT AGACCTGACCAGTCCTGTCCGG-3'	Primer ergeben hybridisiert den „XbaI-Linker“
Meth-Xba2	5'-CGCCGGACAGGACTGGTCAGGTCTAG AGGACGGGTCGGGCCCATGGTCCTGCA-3'	

Um nach der Bisulfit-Reaktion das Ergebnis mittels DNA-Sequenzierung zu kontrollieren, wurde mit den Oligonukleotiden für die Bestimmung zusätzlicher Spezifitäten der Methyltransferasen aus Tabelle 10 der komplette BamHI bzw. XbaI-Linker für die Analyse der Nebenaktivität der Methyltransferase zuzüglich einem Anteil aus Methyltransferase-Gen und Vektoranteil amplifiziert. Die Länge des amplifizierten Fragmentes beträgt bei *M.HgiBI* und *M.HgiEI* ca. 180bp, bei *M.HgiCII* etwa 300bp lang. Für *M.HgiCII* musste ein weiteres *forward*-Oligonukleotid generiert werden, da das *forward*-Oligonukleotid, welches für *M.HgiBI* und *M.HgiEI* abgeleitet wurde, aufgrund von zu großer Sequenzunterschiede nicht verwendet werden konnte.

**Tabelle 10: Oligonukleotide für die Bestimmung zusätzlicher Spezifitäten der Methyltransferasen**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Verwendung
Methyl-X	5'-TTAATGAAGTTGTGTGTATTTAAG-3'	<i>forward</i>	Bisulfit-Analyse <i>M.HgiCII</i>
Methyl-Y	5'-GGGTAAAGTGTTGTAATGTGTA-3'	<i>forward</i>	Bisulfit-Analyse <i>M.HgiBI</i> / <i>M.HgiEI</i>
Methyl-Z	5'-TATACTAAAAATACACCATATACAA-3'	<i>reverse</i>	Reverse-Primer zu Methyl-X oder Methyl-Y

Um zu überprüfen, ob die jeweiligen Klonierungen gelungen waren, wurden die in der Tabelle 11 aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

**Tabelle 11: Oligonukleotide für die überprüfende DNA-Sequenzierung**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung	Verwendung
BIEIseq1	5'-CAACGGTTTACC ATATTTTAG-3'	<i>forward</i>	Sequenzierprimer in der Mitte von M. <i>Hgi</i> BI/ M. <i>Hgi</i> EI
B1EIseq2	5'-AATCGGCGTTT ATCTGGTGG-3'	<i>forward</i>	Sequenzierprimer am Ende von M. <i>Hgi</i> BI/ M. <i>Hgi</i> EI (geht in R. <i>Hgi</i> BI bzw. R. <i>Hgi</i> EI hinein)
RB1seq1	5'-GAAGCCGTTT CATGCATCAC-3'	<i>forward</i>	Sequenzierprimer R. <i>Hgi</i> BI/R. <i>Hgi</i> EI
C2seq1	5'-TTGCACAAAAT CGTGATCGAG-3'	<i>forward</i>	Sequenzierprimer für M. <i>Hgi</i> CII (1)
C2seq2	5'-CGTATTTGCCAT CTTCATATTG-3'	<i>forward</i>	Sequenzierprimer für M. <i>Hgi</i> CII (2)
M13 forward	5'-GTGCCAGCAG CCGCGGTA-3'	<i>reverse</i>	Standardsequenzierprimer
M13 reverse	5'-TTCACACAGGAAAC AGCTATGACC-3'	<i>forward</i>	Standardsequenzierprimer

## 2.8 DNA-Aufreinigungs-Kits

Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

## 2.9 DNA-Marker

Es wurden zwei DNA-Marker verwendet, und zwar die 1kb *ladder* von NEB (Bad Schwalbach) und von Fermentas (St. Leon-Rot). Im Folgenden sind die einzelnen Markerbanden aufgeführt, dick markiert sind im Gel besonders stark leuchtende Banden. In Tabelle 12 sind die Marker grafisch dargestellt.

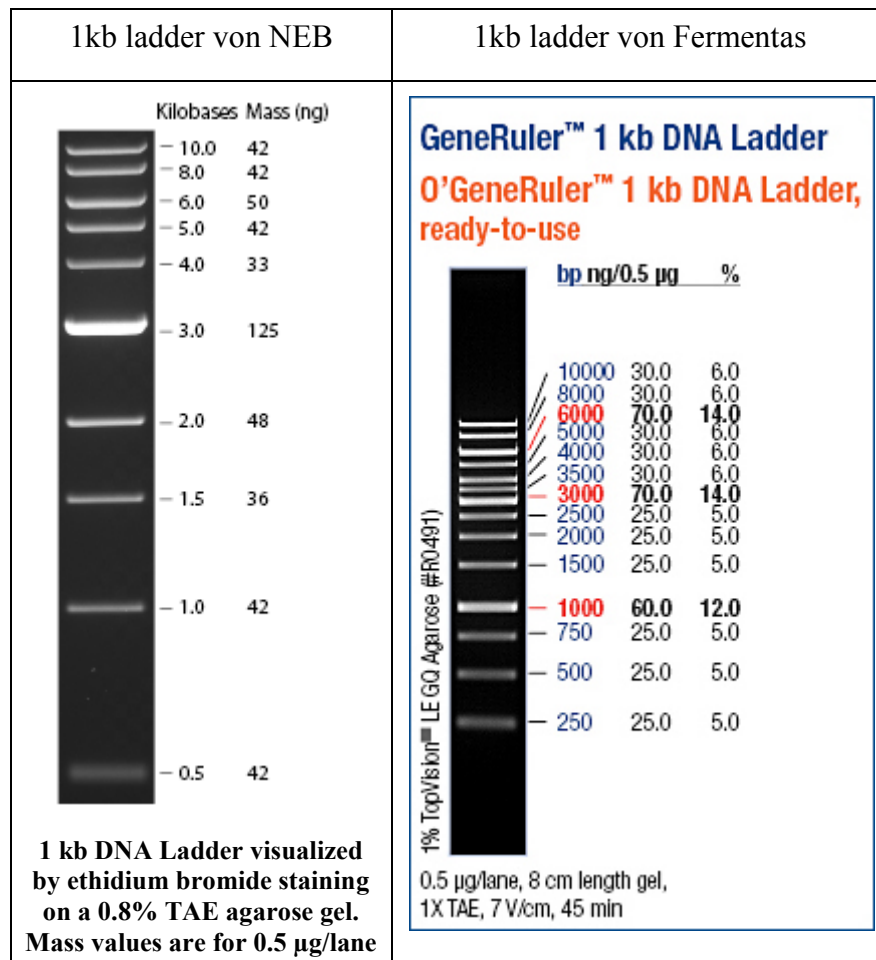
1kb *ladder* von NEB

Markerbanden-Größen: 10kb, 8kb, 6kb, 5kb, 4kb, **3kb**, 2kb, 1,5kb, 1kb, 0,5kb

GeneRuler™ 1kb DNA *ladder* von Fermentas

Markerbanden-Größen: 10kb, 8kb, **6kb**, 5kb, 4kb, 3,5kb, **3kb**, 2,5kb, 2kb, 1,5kb, **1kb**, 0,75kb, 0,5kb, 0,25kb

Tabelle 12: Darstellung der verwendeten DNA-Marker.



## 2.10 Proteinaufreinigung

Qiaexpress Vector Kit – Type IV Vector Kit (Qiagen, Hilden)

Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden)

## 2.11 Proteinmarker

Prestained Protein Molecular Weight Marker von Fermentas (St. Leon-Rot)

Markergrößen: 118kDa, 90kDa, 50kDa, 34kDa, 26kDa, 19kDa

## 3 Methoden

### 3.1 Plasmid-Isolierung in kleinem Maßstab (Minilysat)

Der jeweilige Bakterienstamm wird bei 37°C in dem entsprechenden selektiven LB-Medium über Nacht im Schüttler inkubiert. 1,5ml der Übernachtskultur werden im Eppendorf-Hütchen bei 6000rpm für 5min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird in 300µl der P1-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wird mit 300µl der Lösung P2 durch vorsichtiges Überkopfdrehen gemischt und für längstens 5min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wird die Lösung durch Vortexen mit 300µl der Lösung P3 gemischt und sofort danach mit maximaler Umdrehungszahl 20min in der Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird quantitativ, aber möglichst ohne Schwebeteilchen abgenommen und in Eppendorf-Hütchen mit 450µl Isopropanol überführt. Danach wird durch mehrfaches Überkopfdrehen gemischt. Die Lösung wird für 20min in der Tischzentrifuge mit maximaler Umdrehungszahl bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer ausgezogenen Pipette abgenommen und das Pellet mit 1ml 70% Ethanol gewaschen (dreimal Überkopf-Drehen, Überstand weitgehend abnehmen, 2min bei voller Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugieren, Restüberstand abnehmen). Das Pellet wird bei 37°C oder in der Speed-Vac getrocknet und in 40µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und, wie in Abschnitt 3.2.1 dargestellt, charakterisiert.

### 3.2 *In vitro* Neukombination von DNA

#### 3.2.1 Verdau von Plasmiden

Abhängig von der Menge an Plasmid-DNA wird unterschiedlich vorgegangen, vornehmlich um Kosten zu sparen:

*Analytischer Verdau:* Dieser Verdau dient der Charakterisierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA nach dem Minilysat. Für einen analytischen Verdau werden 3-8µl der erhaltenen Minilysat-DNA mit 5-10 *Units* des ausgewählten Restriktionsenzym versetzt und in dem vorgeschriebenen Puffer für 90 bis 120min bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis der Spaltung wird mit einer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 3.2.2) überprüft.

*Präparativer Verdau:* Präparativ wird verdaut, wenn die entstehenden Fragmente isoliert und z.B. für eine Ligation weiter verwendet werden sollen. Die DNA wird dazu mit 10Units des Enzyms entweder über Nacht (mindestens 15 Stunden) oder, wenn die Gefahr einer sogenannten Star-Aktivität des Restriktionsenzymes vorhanden ist, nur vier Stunden verdaut. Die DNA-Menge ist regelmäßig deutlich höher als bei einem analytischen Verdau.

Nach der Klonierung bzw. nach der Konstruktion eines (neuen) Plasmids gibt es genau drei verschiedene Verdaustrategien, um das entstandene Plasmid zu charakterisieren:

*Rückspaltung:* Wird ein neues Plasmid durch Ligation eines Fragmentes in einen Vektor hergestellt, so wird mit der Rückspaltung ermittelt, ob sich die Klonierungsgrenzen richtig ausgebildet haben. Hierzu wird das entstandene Plasmid mit genau denjenigen Enzymen geschnitten, mit welchen zuvor der Vektor generiert worden ist, z.B. mit *KpnI* und *PstI*. Diese Spaltung ist bei Mischklonierungen (z.B. *BamHI* mit *BglII*) nicht möglich.

*Orientierende Spaltung:* Besitzt das einzubauende Fragment identische Enden, so kann es grundsätzlich in zwei Orientierungen in den Vektor eingebaut werden. Mithilfe einer orientierenden Spaltung kann man herausfinden, in welcher Orientierung das Fragment eingebaut wurde. Dieser Verdau wird in aller Regel mit zwei Enzymen durchgeführt. Ein Enzym darf nur das Fragment und zwar asymmetrisch schneiden, das andere darf nur innerhalb des Vektoranteiles, hier aber beliebig schneiden. So entstehen orientierungsabhängig unterschiedlich große Fragmente. Diese Spaltung entfällt, wenn das Fragment mit unterschiedlichen Enden kloniert wurde.

*Umgreifende Spaltung:* Man muss herausfinden, ob sich mehrere Kopien eines Fragmentes in dem erhaltenen Plasmid befinden. Hierzu wird das erhaltene Plasmid nur mit Enzymen geschnitten, die ausschließlich im Vektoranteil vorkommen. Man kann die Größe des Hybrid-Fragmentes ermitteln und daraus auf die Anzahl der Fragmente, die in den Vektor integriert worden sind, schließen. In der Regel werden Plasmide mit mehr als einem eingebauten Fragment verworfen.

### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

*Analytische Gele:* Für analytische Zwecke werden die verdauten und mit Ladepuffer versetzten DNA-Proben auf ein 1%iges TBE-Agarose-Gel (Agarose NEEO Ultra-Qualität von Roth, Karlsruhe) aufgetragen und mit 60 bis 140V eine halbe bis zwei Stunden, je nach Größe des Gels,

elektrophoresiert. Analytische Gele werden ca. 5min in der Ethidiumbromid-Lösung (1,6mg/ml) gefärbt, dann mindestens 15min in Wasser entfärbt, und schließlich unter Anregung durch UV-Licht 366nm fotografiert. Das Ergebnis wird entweder mittels eines Thermoprinters festgehalten oder digital auf Datenträger gespeichert.

*Präparative Gele:* Bei präparativen Agarose-Gelen wird die Probe zunächst wie bei den analytischen Gele mit EtBr gefärbt, in Wasser entfärbt und danach mittels UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda=320\text{nm}$  visualisiert. So kann man Schäden an der DNA vorbeugen, welche bei höheren Wellenlängen entstehen können (Thymindimere etc.). Dies ist eine Methode, um bestimmte Fragmente von Begleitfragmenten zu reinigen und gleichzeitig die DNA sicher von Restriktionsenzymen, welche eine nachfolgende Ligation verhindern würden, zu befreien.

### **3.2.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen**

Aus einem präparativen Agarose-Gel wird der Abschnitt, welcher die gewünschte DNA enthält, mit Hilfe eines Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gelstück erfolgt mit einem kommerziellen Gelextraktions-Kit. In der vorliegenden Arbeit erfolgte dies mit einem Kit von Qiagen nach dem vorgegebenen Protokoll. Die DNA wird präzipitiert und anschließend in 40 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O eluiert. Zentrifugation für 2min bei mittlerer Stufe in der Speed-Vac-Zentrifuge befreit die Probe von Ethanolresten.

### **3.2.4 Aufreinigung von DNA nach Verdau oder PCR**

Alternativ zu einer Gelextraktion können die Restriktionsenzyme nach einem Verdau über eine Säulenaufreinigung mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) entfernt werden, wenn die unerwünschten Fragmente eine gewisse Länge unterschreiten.

Die Aufreinigung wird nach Herstellervorschrift durchgeführt, und die DNA in 40 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die noch vorhandenen Ethanolreste werden, wie in 3.2.3 beschrieben, entfernt. Ebenso werden PCR-Fragmente nach der Bisulfit-PCR mit demselben Kit von Primern, Nukleotiden und der Polymerase gereinigt, so dass der Ansatz der normalen DNA-Sequenzierung unterworfen werden kann.

### 3.2.5 Dephosphorylierung der isolierten DNA-Fragmente

Wenn bei der Ligation von isolierten Fragmenten eine Selbstligation der einzelnen Fragmente bei der Herstellung der gewünschten Plasmide hinderlich sein könnte, so werden diese dephosphoryliert. Hierzu wird die *Shrimp Alkaline Phosphatase* nach Herstellervorschrift verwendet. Die Inkubationstemperatur ist hierbei von den zu dephosphorylierenden Enden abhängig. Werden 5'-Überhänge dephosphoryliert, so wird der Ansatz für 90min bei 37°C und dann für 20min bei 65°C inkubiert. Bei einem 3'-Überhang wird der Ansatz statt bei 37°C bei 55°C inkubiert.

### 3.2.6 Phosphorylierung von DNA mittels T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK)

Um eine *Blunt-End*-Ligation von unprozessierten PCR-Produkten durchführen zu können, müssen die 5'-Enden der PCR-Produkte phosphoryliert sein; hierzu wird zunächst das Oligonukleotid, mit welchem die PCR-Reaktion durchgeführt werden soll, phosphoryliert, weil man dessen Konzentration kennt und der Ansatz vorher nicht aufgereinigt werden muss. Zur Phosphorylierung werden in einem 20µl Ansatz Oligonukleotide in der Endkonzentration von 25pmol/µl mit 10 *Units* an T4-PNK versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird die T4-PNK durch eine Inkubation für zehn Minuten bei 60°C inaktiviert. Die phosphorylierten Oligonukleotide können ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt für die PCR verwendet werden. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Konzentration der phosphorylierten Oligonukleotide 25pmol/µl beträgt. Von dieser Vorgabe hängt das Volumen der Oligonukleotide in Tabelle 14 ab, um die gewünschte Endkonzentration der Oligonukleotide einzuhalten.

### 3.2.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Sollen Oligonukleotide hybridisiert werden, so werden sie zunächst einzeln phosphoryliert (vgl. oben). Dann werden sie in einem PCR-Reaktionsgefäß 1:1 gemischt. Die Oligonukleotide werden daraufhin zunächst für 15min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Die Temperatur wird anschließend für jeweils eine Stunde bei 60°C und 50°C gehalten, und dann für zwei Stunden auf 37°C abgesenkt. Nach dieser Inkubation erfolgt eine Übernachtinkubation bei 4°C.

### 3.2.8 Klenow-Polymerase-Fill-In

Wenn 3'-Überhänge nach Verdau zu glatten Enden aufgefüllt werden sollen, dann kann dies mit der sogenannten Klenow-Polymerase durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde hierfür die Klenow-Polymerase von Stratagene oder Fermentas nach Herstellervorschrift verwendet.

### 3.2.9 Ligation

Bei der Verknüpfung von DNA-Fragmenten macht man sich die Eigenschaften der T4-DNA-Ligase zu Nutze. Nur diese Phagen-Ligase ist in der Lage, die Verknüpfung von zwei DNA-Enden zu katalysieren, wenn mindestens eines der beiden 5'-Enden eine Phosphatgruppe trägt. In der Praxis wird der Vektor dephosphoryliert (vgl. Abschnitt 3.2.5), um Vektorselbstligation zu verhindern und damit die Isolierung der Klone aus der Ligation zu vereinfachen. Bei der Ligation wird die zu verknüpfende DNA oder ein Gemisch aus Vektor und Insert im Ansatz von 20 bzw. 40 µl Gesamtvolumen mit 5 *Units* T4-DNA-Ligase versetzt und entweder für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Sollen PCR-Produkte mit einem vorher geschnittenen Plasmid ligiert werden, so sollte das Verhältnis von Plasmid zu PCR-Produkt ungefähr 1:3 betragen. Die Menge der Proben kann entweder mit einer Absorptionsmessung der DNA bei OD<sub>260</sub> bestimmt oder auf dem Agarose-Gel abgeschätzt werden. Werden mit dieser Methode PCR-Produkte *blunt-end* ligiert, so müssen zuvor die 5'-Enden der PCR-Produkte mit der T4-PNK (vgl. Abschnitt 3.2.6) phosphoryliert werden. Als Puffer wurde der von den kommerziellen Herstellern mitgelieferte Puffer nach Herstellerangaben benutzt. In dieser Arbeit wurde ATP in der Endkonzentration 10mM zugesetzt.

## 3.3 Herstellung kompetenter Zellen in kleinem Maßstab

Eine Übernachtskultur von z.B. SURE<sup>®</sup>-Zellen in nicht-selektivem Medium wird mit nicht-selektivem Medium (s.o.) verdünnt (je nach Dichte und Wachstumsfähigkeit der Zellen z.B. 1:60, 1:100, 1:200) und bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,3-0,6 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wird zunächst für 5min auf Eis inkubiert. Daraufhin werden 1,5ml der Kultur in Eppendorf-Hütchen abgefüllt und 4min bei 5000rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl einer eisgekühlten 70mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und für mindestens 15min auf Eis inkubiert. Diese Zellsuspension wird wie oben zentrifugiert, das Pellet erneut in 100 µl 70mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und mindestens 20min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit



sind die Zellen kompetent und können transformiert werden. Pro 100µl kompetente Zellen kann eine Transformation durchgeführt werden. Die Zellen bleiben bei 4°C auch bis zum nächsten Tag kompetent.

Eine Ausnahme bildet die Herstellung der kompetenten Zellen zum Einbringen eines zweiten Plasmides. Bei *E.coli* –Stämmen, die bereits die Plasmide pHK662, pKF1, pKF2 und pKF26 enthalten, wird ein Medium verwendet, welches 1mM IPTG und 10µM Tetrazyklin enthält.

### 3.4 Transformation von *E.coli* –Zellen mit neukombinierter DNA

Die unter 3.3 gewonnenen kompetenten Zellen werden entweder mit ringförmiger Plasmid-DNA oder mit einem Ligationsansatz transformiert (Volumen der hinzugefügten DNA-Lösung beträgt zwischen 1 und 10µl). Die DNA wird zu den Zellen gegeben und die Suspension durch Ansnippen vorsichtig gemischt. Die Zellen werden für mindestens 15min auf Eis, dann 5min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt eine weitere Inkubation der Zellen für mindestens 5min auf Eis. Die Zellen werden dann mit 500µl LB-Medium ohne Antibiotikum gemischt und für 45min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Bei Verwendung von Platten mit Chloramphenicol werden die Zellen statt 45min für 90min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation werden die Zellen auf Platten mit Selektionsmedium ausgestrichen. Die Auswertung erfolgt nach Standardvorschriften (MANIATIS 1982).

### 3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 3.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient dazu, beliebige DNA-Abschnitte bis zu einer Größe von 14kb *in vitro* zu amplifizieren (MULLIS und FALOONA, 1987). Hierzu müssen durch zwei Oligonukleotide, auch *Primer* genannt, die äußeren Grenzen des zu amplifizierenden Fragmentes definiert werden. Die 5'-Enden der *Primer* müssen dabei entgegengesetzt gerichtet und in einem sehr hohen Überschuss vorhanden sein. Weiterhin benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase I, dNTPs und Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Die üblicherweise verwendete DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) hat keine Reparaturfunktion. In dieser Arbeit wird ausschließlich die Polymerase I aus *Thermus flavus* (*Tfl*) verwendet. Mit ihr gelingen regelmäßig Amplifikationen von 6kb und mehr ohne nennenswerte Fehler.

Es gibt verschiedene Phasen der PCR. Zunächst wird durch Erhitzen auf etwa 94°C das *template*, also die DNA, aus welcher ein Abschnitt amplifiziert werden soll, denaturiert, d.h. zum Einzelstrang aufgeschmolzen. Danach folgt das sogenannte *Annealing*, in der die *Primer* an ihre komplementäre Sequenz binden. Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung des *Primer*. Sie kann vereinfacht mit der *Wallace*-Formel (vgl. Formel 1) berechnet werden. In eckigen Klammern befindet sich die vereinfachte Formel für die Berechnung der Schmelztemperatur, welche die Grundlage für die Berechnung der *Annealing*-Temperatur bildet.

$$T_m = [\sum (A \wedge T) * 2^\circ\text{C} + \sum (C \wedge G) * 4^\circ\text{C}] - 5^\circ\text{C}$$

**Formel 1: Darstellung der Wallace-Formel für die Berechnung der Schmelztemperatur der Primer.**

Nach dem *Annealing* wird die DNA durch die hitzestabile Polymerase bei derjenigen Temperatur amplifiziert, bei welcher das Temperaturoptimum der eingesetzten Polymerase liegt. Bei der hier verwendeten *Tfl*-Polymerase sind dies 72°C. Die Zeit der Amplifizierung ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA. Man legt dabei zugrunde, dass etwa 1000 Basenpaare in einer Minute polymerisiert werden.

Die drei Schritte (Denaturierung, *Annealing*, Amplifikation) können theoretisch beliebig oft wiederholt werden. Bei jedem Zyklus sollte die Anzahl der entstehenden Fragmente verdoppelt werden. Das ist aber ein Wert, der in der Praxis kaum erreicht wird. Besonders im späteren Verlauf der PCR ist die Ausbeute niedriger. Dies kommt zum Teil daher, dass die entstehenden Fragmente mit dem *Primer* um die Bindestelle an dem *template* konkurrieren. Je mehr Produkt, desto mehr können die amplifizierten Produkte zusätzlich zu dem *Primer* an das *template* binden und desto weniger Produkt gibt es dann im Nachhinein.

Das verwendete Wasser war autoklaviertes HPLC-Wasser (sehr reines Wasser!). Ein typisches Programm, welches verwendet worden ist, ist in der Tabelle 13 dargestellt. Für die PCR wurden Thermocycler entweder von der Firma Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400; Rodgau) oder von der Firma Biorad (My Cycler; München) verwendet. Das Pipettierschema für einen typischen PCR-Ansatz ist in der Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 13: Typisches PCR-Programm

Anzahl Zyklen	Temperatur, Zeit der einzelnen Schritte
1x	94°C, 180s Denaturierung
10x	94°C, 30s Denaturierung, 54°C, 30s <i>Annealing</i> , 72°C, 90s Polymerisierung
25x	94°C, 30s Denaturierung, 59°C, 30s <i>Annealing</i> , 72°C, 90s Polymerisierung
1x	72°, 300s Komplettierung, Schlusstemperatur 8°C

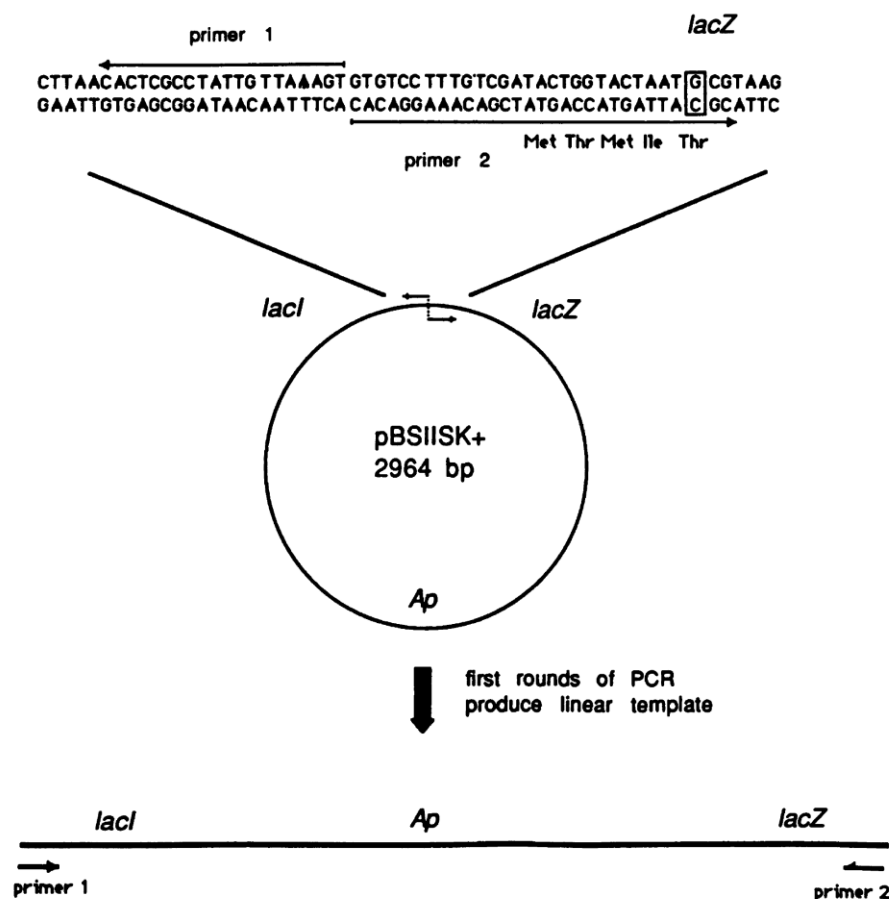
Tabelle 14: Typisches Pipettierschema für eine PCR.

Chemikalie (Konzentration)	Volumen
DNA	5µl
Vorwärts-Primer (10pmol/µl)	4µl
Rückwärts-Primer (10pmol/µl)	4µl
dNTPs (10mM each)	4µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	8µl
20x Tfl-Reaktionspuffer	5µl
Tfl-Polymerase	1,2µl
ddH <sub>2</sub> O	69µl
Σ	100,2µl

### 3.5.2 Zielgerichtete Mutagenese mit einem Primerpaar (*site directed mutagenesis*)

Mit Hilfe der sogenannten inversen PCR (zuerst beschrieben von HEMSLEY *et al.*, 1989, aufbauend auf der Arbeit von TRIGLIA *et al.* 1988) gelingt die Mutagenese über PCR mit nur zwei *Primern*. Man benötigt das Zielgen auf einem Plasmid, einen exakt passenden *Primer* und einen *Primer* mit einer Sequenzabweichung. Abbildung 13 gibt ein Beispiel für die zielgerichtete Mutagenese mit einem Primerpaar.

Die zwei verwendeten *Primer* wirken in die entgegengesetzte Richtung. Sie schließen am 5'-Ende direkt aneinander an, während ihre 3'-Enden quasi nach außen zeigen. Mit Hilfe dieser Anordnung gelingt die Amplifikation eines gesamten Plasmides inklusive des Selektionsmarkers und des *Origin of replication* (ori). In der Regel werden bis zu 6kb amplifiziert. Wichtig ist die Tatsache, dass nur ein *Primer* eine Mutation innerhalb seiner Sequenz trägt, so dass nach der PCR eine veränderte Sequenz des Plasmides resultiert, die nach Transkription und Translation des Genes in der gewünschten Aminosäure-Veränderung resultiert. Anders als in Abbildung 13 dargestellt ist es von Vorteil, wenn sich die einzuführende Mutation am 5'-Ende der *Primer* befindet. Die Veränderung kann eine einfache Punktmutation sein. Besser ist es allerdings, mehrere Basen zu ändern, da eine Punktmutation in der Zelle leicht verändert werden kann, wenn ein Selektionsdruck ausgeübt wird. Der zweite *Primer*, der entgegengesetzt zum ersten *Primer* gerichtet ist, sollte keine Mutation tragen.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der inversen PCR, entnommen aus HEMSLEY (1989).** Die vergrößerte Sequenz zeigt, wie die Primer mit den 5'-Enden aneinander anschließen. Umrahmt ist die mittels des Primers eingeführte Mutation. Nach der inversen PCR entsteht ein lineares Produkt, welches über *Blunt-End-Ligation* verknüpft wird und dann für eine Transformation verwendet werden kann.

Mit diesen beiden *Primern* wird eine PCR durchgeführt. Bei der Auswahl der *Annealing-Temperatur* ist der *mismatch*, welcher bei einem der benutzten Primer vorliegt, zu berücksichtigen. So können z.B. zehn Zyklen der PCR bei der erniedrigten Schmelztemperatur durchgeführt werden, wie sie durch die Formel im Abschnitt 3.5.1 dargestellt ist. Danach wird die Temperatur genau um die Differenz angehoben, die für den *mismatch* errechnet wurde. Dieses führt dazu, dass die *Primer* besser an solche Sequenzen binden, die bereits verändert worden sind.

Wird ein Plasmid als *template* für die inverse PCR genutzt, welches ein Gen kodiert, so entsteht im Zuge der PCR ein verändertes „Plasmid“, welches zunächst als lineare DNA vorliegt. Da in dem nächsten Schritt das lineare „Plasmid“ durch Ligation (vgl. 3.2.9) zirkularisiert werden muss, die Primer aber nach der Oligonukleotidsynthese kein 5'-Phosphat besitzen, müssen sie vor der Mutagenese-PCR durch die T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert werden (vgl. 3.2.6), um der T4-Ligase für die Katalyse der Verknüpfung von DNA-Enden 5'-Phosphat-Enden anzubieten.

Besonders für diese Methode darf die bekannte thermostabile Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) nicht eingesetzt werden. Sie fügt unspezifisch ein Desoxy-Adenosin an das 5'-Ende an. Der Gebrauch der *Tfl*-Polymerase verhindert effektiv diese unerwünschte Nebenreaktion. Da

dies häufig nicht beachtet wird, hat sich diese vereinfachte Mutagenese-Methode nicht durchgesetzt.

### 3.5.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der erhaltenen Klone und der Mutanten erfolgte durch den institutseigenen Sequenzierservice (Gerät ABI *Prism Genetic Analyzer* 300). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenziermethode beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs nach SANGER *et al.* (1977). Es wurde das *cycle-sequencing* benutzt, die hierbei verwendeten Terminatoren waren fluoreszenz-markiert (*Big Dye Terminator* Technologie der Firma Applied Biosystems, Darmstadt).

### 3.6 Bisulfit-Reaktion

Die Bisulfit-Methode bietet eine Möglichkeit zu ermitteln, an welcher Stelle einer DNA sich C5-methylierte Cytosine befinden. Sie wurde in dieser Form zum ersten Mal von FROMMER *et al.* (1992) beschrieben. Man bedient sich der länger bekannten Tatsache, dass C5-methylierte Cytosine relativ reaktionsträge gegenüber einem nukleophilen Angriff am C4 sind. Natrium-Bisulfit (Natriumpyrosulfat, Summenformel  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) zerfällt in wässriger Lösung zu zwei Molekülen  $\text{HSO}_3^-$  und greift in dieser Form bevorzugt nicht methylierte Cytosine in einzelsträngiger DNA an. Das sulfonierte Cytosin kann leicht durch Hydrolyse desulfoniert werden, so dass in der Nettoreaktion die Amino-Gruppe am C4 durch eine Hydroxylgruppe ersetzt wird. Es entsteht Desoxy-Uridin. C5-methylierte Cytosine werden nicht angegriffen, und werden demzufolge nicht zu Desoxy-Uridin deaminiert. Nach Bisulfit-Behandlung liegt die DNA dauerhaft denaturiert vor. Man kann jetzt eine PCR durchführen, bei der die entsprechend synthetisierten Primer selektiv nur noch an einen der beiden DNA-Stränge binden. Mittels dieser sogenannten Bisulfit-PCR kann man ein Fragment, welches mindestens eine veränderte Erkennungs-Sequenz der zu untersuchenden Methyltransferase enthalten sollte, amplifizieren. Vorteilhaft ist es, wenn das resultierende Fragment etwa 300 Basenpaare lang ist, da die DNA durch die Bisulfit-Behandlung zusätzlich zu der Veränderung der Basen unspezifisch fragmentiert wird. Zusätzlich liefert dies optimale Ergebnisse bei der nachfolgenden Sequenzierung, weil die gesuchte Position auf beiden Strängen optimal erkannt werden kann. Sequenziert wird mit denselben Primern, mit welchen das deaminierte Fragment amplifiziert worden ist. Befinden sich in einer Sequenz nach der Bisulfit-Behandlung weiterhin Cytosine, so kann man den Schluss

ziehen, dass diese Cytosine an C5 methyliert gewesen sind. Alle nicht methylierten Cytosine erscheinen in der Sequenz als Thymidine, da in der PCR alle Desoxy-Uridine durch Thymidine ersetzt worden sind. Die Erkennungssequenz der Methyltransferasen lässt sich aus diesen Daten direkt zuordnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur praktischen Durchführung die Anleitung von WARNECKE *et al.* (2002) modifiziert. In der Reaktion werden 120ng der zu analysierenden DNA eingesetzt, da es sich zeigte, dass bei einer zu hohen Menge an Ausgangsmaterial mehr Nebenprodukte bei der nachfolgenden Bisulfit-PCR entstanden (vgl. eigene Diplomarbeit).

Die DNA wird mit 1M frisch hergestellter NaOH (Endkonzentration 0,3M) versetzt, und für 15min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt dient der Einzelstrangherstellung, da das Bisulfit-Reagenz nur an einzelsträngiger DNA wirken kann. Die einzelsträngige DNA wird mit 2,3M frisch hergestellter Bisulfit-Lösung (Endkonzentration 2M) versetzt.

Beachtet werden muss, dass die Bisulfit-Lösung bei der Herstellung nicht gevortext, d.h. nicht stark geschüttelt werden darf. Molekularer Sauerstoff greift das Reagenz an und verhindert so die Reaktion. Zur Lösung des Bisulfits muss 400µl 10M NaOH-Lösung auf 10ml zugegeben werden, da es sonst nicht zu einer vollständigen Lösung des Pyrosulfates kommt. Die Lösung sollte zusätzlich auf 37°C erwärmt werden, dies hilft beim Lösungsvorgang.

Zu der Lösung aus einzelsträngiger DNA und 2,0M Bisulfit wird frisch hergestellte Hydrochinon-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5mM gegeben und gemischt, ohne dass zuviel Sauerstoff aufgenommen werden kann. Anschließend wird diese Mischung nach Überschichtung mit Mineralöl für 16 Stunden bei 55°C im Dunkeln im Heizblock inkubiert.

Das Reaktionsgemisch wird dann unter dem Öl abgenommen und mittels einer Sephadex-Säule (Sephadex G50 von Sigma-Aldrich, Säulchengerüst von Qiagen, *Dye Ex-Kit*) entsalzt.

Die entsalzte Lösung wird mit 1M NaOH (Endkonzentration 0,33M) versetzt und für 15min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Danach wird eine am Tag zuvor hergestellten 10M Ammoniumacetat-Lösung (Endkonzentration 3M) hinzugegeben. Die Ammoniumacetat-Lösung sollte zum Lösen ebenfalls auf 37°C erwärmt werden und darf kräftig gevortext werden.

Nach der Zugabe von Ammoniumacetat-Lösung wird die mit Bisulfit behandelte DNA mit 400µl 2-Propanol versetzt und für 20min in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 bis 100µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und ein Aliquot (5µl) für die darauffolgende PCR als *template* benutzt. In der Tabelle 15 ist das bei der Bisulfit-PCR verwendete Programm aufgeführt.

**Tabelle 15: Verwendetes PCR-Programm für die Bisulfit-PCR.** Leichte Variationen der *Annealing*-Temperatur bei Verwendung anderer Primer können die Ausbeute verbessern.

Anzahl Zyklen	Temperatur, Zeiten der einzelnen Schritte
1x	94°C, 180s Denaturierung
10x	94°C, 30s Denaturierung, 52°C, 30s <i>Annealing</i> , 72°, 45s Polymerisierung
25x	94°C, 30s Denaturierung, 56°C, 30s <i>Annealing</i> , 72°, 45s Polymerisierung
1x	72°C, 300s Komplettierung, Schlusstemperatur 8°C

### 3.7 Expression, Aufreinigung und Analyse von ausgewählten Proteinen

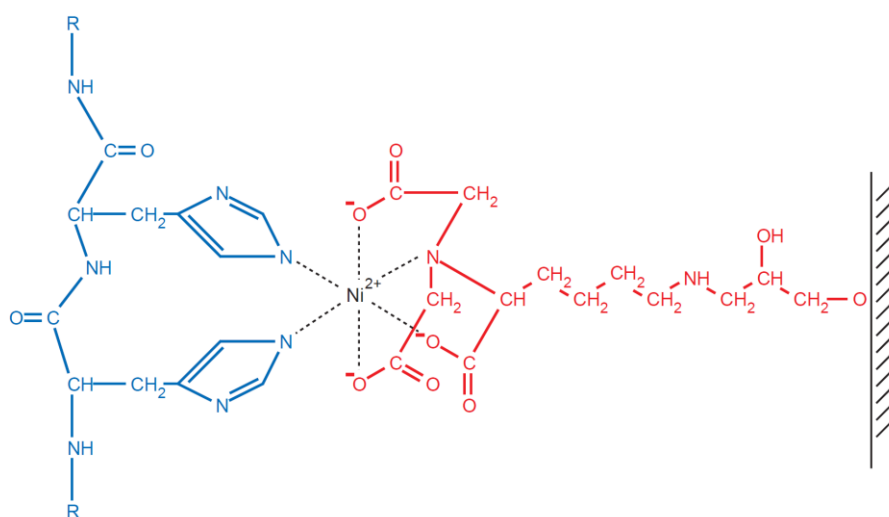
#### 3.7.1 Expression von Endonukleasen und Methyltransferasen

Um biotechnisch veränderte Restriktionsenzyme oder Methyltransferasen charakterisieren zu können, müssen diese zunächst z.B. in *E.coli* überexprimiert werden. Hierzu werden in dieser Arbeit mit IPTG induzierbare Systeme verwendet. Die Basis für die Expression der Endonukleasen R.HgiBI, R.HgiEI und R.HgiCII wurde von BLUM *et al.* (1994) gelegt. BLUM klonierte als erster diese Endonuklease-Gene als C-terminale Hexa-Histidin-Fusionen und konnte die Enzyme erfolgreich aufreinigen und charakterisieren. Die Expression von Methyltransferasen wurde hier analog auf Basis des Expressionsplasmids pQE30 mit N-terminalem His-Tag durchgeführt und wird im Ergebnisteil näher erläutert.

Es werden zwei unterschiedliche Ansatzgrößen verwendet. Für eine erste Testexpression wird zunächst eine Übernachtskultur im Volumen von 50ml auf  $OD_{600}=0,15$  für Methyltransferasen oder 0,2 für Restriktionsenzyme verdünnt. Daraufhin wird die Kultur bei 37°C inkubiert, bis ein Mindestwert von  $OD_{600}=0,6$  erreicht wird. Die Induktion erfolgt mit IPTG, bei den Restriktionsenzymen mit 0,8mM Endkonzentration, bei den Methyltransferasen mit 1mM Endkonzentration. Die Induktion erfolgt für vier Stunden bei 37°C, bei den Methyltransferasen aufgrund mangelnder Löslichkeit der Proteine zusätzlich für 16 Stunden bei 17°C. Für ein analytisches SDS-Gel werden jeweils Proben vor der Induktion, und eine, zwei, drei und vier Stunden nach der Induktion entnommen. Die restliche Kultur wird bei 6500rpm bei 4°C abzentrifugiert und eingefroren (-20°C oder -80°C). Das exprimierte Protein kann dann über His-Tag-Aufreinigung isoliert werden. Eine präparative Aufreinigung des Proteins wird in einem Volumen von 300ml unter sonst identischen Bedingungen durchgeführt.

### 3.7.2 His-Tag-Aufreinigung von Proteinen

Die His-Tag-Aufreinigung ist eine schnelle und effektive Methode zur Isolierung von Proteinen. Häufig ist keine weitere Aufreinigung der isolierten Proteine mehr notwendig. Sie wurde von HOCHULI *et al.* (1987) entwickelt, und wird mittlerweile erfolgreich kommerziell vertrieben (z.B. von Qiagen). Mit dieser Methode können Proteine entweder in denaturierter Form (HOCHULI *et al.* 1988) oder nativer Form (JANKNECHT *et al.* (1991); VAN DYKE *et al.* (1992)) isoliert werden. Das Prinzip basiert darauf, dass Proteine mit einem Histidin-Tag (auch His-Tag genannt, z.B. sechs Histidine entweder N-terminal oder C-terminal) bevorzugt an eine mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladene Nitrilo-Tri-Acetat-Matrix (auch Ni-NTA-Matrix genannt) binden, wohingegen Proteine ohne diesen His-Tag nicht binden und leicht ausgewaschen werden. Eine schematische Darstellung dieser Interaktion ist in der Abbildung 14 zu finden. Der Erfolg dieser Methode hängt naturgemäß davon ab, ob die zusätzlichen Aminosäuren mit der Faltung oder der enzymatischen Aktivität des Proteins interferieren. Das muss von Fall zu Fall untersucht werden.



**Abbildung 14: Modell der Interaktion der aufzureinigenden Proteine mit His-Tag (in blau) mit der Ni-NTA-Matrix (in rot) über das komplexierte  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion (in schwarz).**

Diese Abbildung wurde der Anleitung zur Aufreinigung von His-Tag-Proteinen von Qiagen- QIAexpressionist – entnommen.

Die gewünschten Proteine können nach Waschen der Säule mit Imidazol, welches der Aminosäure Histidin in der chemischen Struktur sehr ähnelt, von dieser Matrix abgelöst werden. Die hier verwendete Ni-NTA-Matrix und die dazugehörigen Säulen wurden von Qiagen (Hilden) bezogen. Das hier verwendete Protokoll folgt den Herstellerangaben und ist optimiert nach dem Praktikumsskript des Instituts für Mikro- und Molekularbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Das Zellpellet der kleinen oder großen Expression wird zunächst in Lysepuffer aufgenommen (Gesamtvolumen 2x 1ml). Dann wird 20µl einer 100mg/ml Lysozymlösung hinzugegeben (20µg/ml Endkonzentration). Die Zellen werden nun für 30min auf Eis inkubiert und zwischendurch durch Überkopfdrehen gemischt. Daraufhin erfolgt die Lyse der Zellen mit



Ultraschall im Eppendorf-Gefäß. Jede Zell-Probe wird dreimal 1min lysiert (40%, 40%, 50% Intensität). Nach der Ultraschallbehandlung wird das Lysat durch Zentrifugation bei 11700rpm, 4°C in der Tischzentrifuge geklärt. Der Überstand der Zentrifugation wird auf die Säule überführt, welche zuvor mit 0,4ml Ni-NTA-Agarose beladen, mit 4ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 1ml Lysepuffer equilibriert wurde. Die Säule wird dann verschlossen und für mindestens eine Stunde bei 4°C auf einem Taumelrollmischer inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die Säule geöffnet, das Lysat ausgelassen und noch zweimal über die Säule geladen. Hierauf erfolgt das Waschen. Zunächst wird sechsmal mit 1ml Lysepuffer, dann sechsmal mit 1ml Waschpuffer 1, dann viermal mit Waschpuffer 2. Die Elution erfolgt zunächst mit Elutionspuffer 1 (viermal 100µl, von welchen die ersten 100µl verworfen werden, dann zweimal mit 100µl), woraufhin sich die Elution mit Elutionspuffer 2 anschließt. Die ersten 100µl dieser Elution werden mit der zweiten Elution mit Elutionspuffer vereinigt. Daraufhin wird noch zweimal eine Elution mit dreimal 100µl Elutionspuffer durchgeführt. Wichtig ist es, zwischen den einzelnen Elutionsschritten jeweils eine Minute zu warten, damit es zu einer effektiven Ablösung der exprimierten Proteine von der Matrix kommt. Bei den einzelnen Schritten (Gesamt-Zell-Extrakt, geklärtes Lysat, Waschritte 1-3 und Lysate) werden Proben entnommen, um das Ergebnis der Aufreinigung auf einer SDS-PAGE aufzutrennen.

### 3.7.3 SDS-PAGE

Mittels der von LAEMMLI erfundenen SDS-Gelelektrophorese (LAEMMLI 1970, LAEMMLI und FAVRE 1973) können Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Dies beruht darauf, dass sich SDS relativ gleichmäßig an Proteine anlagert und diese mit einer negativen Ladung versieht, die proportional zu ihrer Größe ist. Die so „beladenen“ Proteine wandern im Gel zur Anode. In der vorliegenden Arbeit ist ein diskontinuierliches SDS-Gel verwendet worden. Das Trenngel ist immer 14%ig, das Sammelgel immer 4%ig. Das Pipettierschema für die verwendeten Gele ist in Tabelle 16 dargestellt. Beispiele für SDS-PAGE-Gele finden sich im Kapitel 4 (Ergebnisse).

**Tabelle 16: Mix von Trenn- und Sammelgel.**

Trenngel 14%		Sammelgel 4%	
Lösung	Volumen	Lösung	Volumen
Acrylamid (30%, 37,5:1)	4,67ml	Acrylamid (30%, 37,5:1)	1,3 ml
4x Trenngelpuffer	2,5ml	4x Trenngelpuffer	2,5 ml
10% SDS	0,1ml	10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,05ml	10% APS	0,05 ml
TEMED	0,005ml	TEMED	0,01 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,68ml	ddH <sub>2</sub> O	6,1 ml
Summe	10ml	Summe	10ml

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ATGA-Klone

Durch eigene Vorarbeiten wurden unterschiedliche Konstrukte zur Expression der Methyltransferasen *M.HgiBI* und *M.HgiEI* hergestellt (Diplomarbeit). Der Unterschied innerhalb dieser Konstrukte lag in der Variation der Entfernung zwischen Stoppcodon des  $\text{LacZ}_{\alpha}$ -Leserahmen und Startcodon des Leserahmens der Methyltransferase. Ein Typ dieser Konstrukte, nämlich der sogenannte ATGA-Übergang, konnte nicht erhalten werden. Hierbei überlappt das Stoppcodon des  $\text{LacZ}_{\alpha}$ -Leserahmen mit dem Startcodon der Methyltransferase folgendermaßen:

#### ATGA

Hierbei ist das Start-Codon der Methyltransferase kursiv geschrieben, unterstrichen ist das Stoppcodon des  $\text{LacZ}_{\alpha}$ -Leserahmens (vgl. Tabelle 17). Dieses Konstrukt konnte in dem Stamm SURE<sup>®</sup>, der speziell für die Klonierung von Methyltransferasen entwickelt wurde, nicht erhalten werden. Dieses Ergebnis war überraschend, da in SURE<sup>®</sup> jede bekannte Abwehr ausgeschaltet ist.

**Tabelle 17: Darstellung der Konstrukte aus der eigenen Diplomarbeit zur Variation der Entfernung zwischen STOP- und START-Codon.** Die Skalierung der einzelnen Gene ist schematisch dargestellt und entspricht nicht den tatsächlichen Gengrößen.

Beschreibung der Konstrukte	Schematische Darstellung	Beispiel-Bezeichnung der Klone bei <i>M.HgiBI</i>
$\text{LacZ}_{\alpha}$ -Leserahmen überlappt START-Codon von Methyltransferase um 25 Codons		pBIM-1
STOPP des $\text{LacZ}_{\alpha}$ -Leserahmens fünf CODONS vor dem Startcodon der Methyltransferase		pBIM-5
$\text{LacZ}_{\alpha}$ -Fusion (Methyltransferase verlängert den $\text{LacZ}_{\alpha}$ -Leserahmen)		pBIM+21
$\text{LacZ}_{\alpha}$ -STOPP überlappt mit dem START-Codon der Methyltransferase um vier Nukleotide (ATGA-Konstrukt)		ATGA BI

Das einzige erhaltene ATGA-Konstrukt war eine Mutante, welche eine verringerte GGWCC-Aktivität und keine GGSCC-Aktivität zeigte. Entweder war also die jetzt erreichte Konzentration an Methyltransferasen für die Zelle schädlich, oder die bei den anderen Konstrukten gefundene Nebenaktivität GGSCC war jetzt für die Zelle schädlich. Beide Annahmen widersprechen den beschriebenen Stammeigenschaften des kommerziellen *E.coli*- Stammes SURE<sup>®</sup>, bei dem alle bekannten Abwehrmechanismen ausgeschaltet sein sollten.

#### 4.1.1 Klonierung der ATGA-Konstrukte in verschiedenen *E.coli*-Stämmen

Das Problem der Nichtklonierbarkeit des ATGA-Konstruktes im Stamm SURE<sup>®</sup> wurde in dieser Arbeit weiter verfolgt. Ein Versuch im studentischen Praktikum lieferte relativ schnell eine neue Lösung. Es wurde beobachtet, dass das komplette System von RM.*Hgi*BI (mittels des Plasmids pBI-His in die Zellen transformiert) bei *E.coli* BL21-Zellen eine höhere Ausbeute ergab, als in SURE<sup>®</sup>-Zellen. Daraufhin wurde überprüft, ob sich das oben genannte ATGA-Konstrukt nicht gleichfalls in BL21-Zellen etablieren lassen könnte.

Zu diesem Zweck wurden die Gene für M.*Hgi*BI, M.*Hgi*CII und M.*Hgi*EI mittels der in Tabelle 3 dargestellten Primer entweder aus bereits vorhandenen Plasmiden (M.*Hgi*EI, M.*Hgi*BI) oder aus dem Genom von *Herpetosiphon giganteus* Isolat Hpg9 (M.*Hgi*CII) über Linker-PCR so amplifiziert, dass nach *KpnI*/*PstI*-Verdau der entstehenden Fragmente und nach Ligation mit dem Vektoranteil des mit *KpnI*/*PstI* geschnittenen Vektors pBI-His die gewünschte LacZ<sub>α</sub>-Anbindung entstehen konnte. Erstaunlicherweise konnten sowohl M.*Hgi*BI als auch M.*Hgi*EI als ATGA-Konstrukte in BL21-Zellen hergestellt werden. Die erhaltenen Konstrukte wurde ATGA BI und ATGA EI genannt und zeigten bei einer Übersequenzierung keine Abweichung zu der Originalsequenz. Die Klonierung des ATGA-Konstruktes von M.*Hgi*CII gelang sowohl in BL21-Zellen als auch in SURE<sup>®</sup>. Beide zeigten einen guten *Ava*II-Schutz. Die anschließende Kontroll-Sequenzierung mit jeweils einem Klon aus SURE<sup>®</sup> und BL21 zeigte jedoch, dass der Klon aus SURE<sup>®</sup> eine Phenylalanin nach Alanin-Mutation an der Position 391 trug. Diese Mutation war in dem für die Ligation verwendeten PCR-Fragment nicht vorhanden, ist also nicht durch einen früheren Sequenzierfehler zu erklären. Deshalb muss angenommen werden, dass neben M.*Hgi*BI und M.*Hgi*EI auch das ATGA-Konstrukt von M.*Hgi*CII für SURE<sup>®</sup>-Zellen schädlich ist.

Dieses einheitliche Ergebnis wurde nur für den SURE<sup>®</sup>-Stamm erhalten, so dass sich die Frage stellt, warum die Klonierung der ATGA-Konstrukte in BL21-Zellen möglich ist, obwohl in diesen Zellen nur *mcrA* als Komponente der Fremd-Methylierungsabwehr deletiert ist. In der

Zwischenzeit ist das Genom von *E.coli* BL21 vollständig sequenziert worden (Genbank-No AM946981 und CP001509, JEONG *et al.* 2009).

Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die Abwehrsysteme in den hier verwendeten *E.coli*-Stämmen.

<i>E.coli</i> -Stamm	Gene					
	<i>mcrA</i>	<i>mcrB</i>	<i>mcrC</i>	<i>mrr</i>	<i>dcm</i>	<i>vsr</i>
SURE®	X	X	X	X	√	√
XL1blue-MRF <sup>+</sup>	X	X	X	X	√	√
HB101	√	X	X	X	√	√
BL21	X	√	√	√	X	X

**Tabelle 18:** Anwesenheit verschiedener Gene für die Fremdmethylierungsabwehr in vier verschiedenen *E.coli*-Stämmen. Neben den vier bekannten Abwehrsystemen wird auch das *dcm/vsr*-System aufgeführt. Legende: √ = Gen vorhanden, X = Gen deletiert

Während SURE® und XL1-blue MRF<sup>+</sup> alle vier Gene für die Fremdmethylierungs-Abwehr verloren, dafür aber *dcm* und *vsr* behalten haben, hat HB101 neben *dcm* und *vsr* auch noch *mcrA*. BL21 hat dagegen nur *mcrA*, aber auch *dcm* und *vsr* verloren.

Die zelluläre Funktion der Desoxycytidin-Methyltransferase (*dcm*) ist nicht bekannt. Es ist nur bekannt, dass sie als C5-Methyltransferase die Sequenz CCWGG methyliert, und zwar am äußeren Desoxy-Cytidin. MERKL *et al.* (1992) konnten auf Grund statistischer Untersuchungen belegen, dass das Enzyme *very short patch repair* (Vsr) -Endonuklease das Hydrolyse-Produkt von 5-Methyldeoxycytidin, das Desoxy-Thymidin, selektiv gegen Desoxy-Cytidin austauscht, wenn es in dem Kontext CTAG einem Desoxy-Guanosin gegenübersteht.

#### 4.1.2 Effekt von Dcm und/oder Vsr auf die Klonierung von ATGA-Klonen

Um den Effekt von Dcm und/oder Vsr auf die Klonierung der ATGA-Konstrukte in BL21 zu überprüfen, wurde versucht, drei verschiedene Kombinationen der für Dcm bzw. Vsr kodierenden Gene in BL21 zu klonieren:

1. Dcm: Klonieren von *dcm* (keine LacZ<sub>α</sub>-Fusion, eigener Promotor)
2. Dcm + Vsr: Klonieren von *dcm* (s.o.) und *vsr* (in einem Operon)
3. Vsr: Klonieren von *vsr*; die Klonierung umfasst *vsr* und einen ungefähr 100bp langen Bereich vor *vsr*.

Die Gene wurden über die in Tabelle 4 aufgeführten Primer aus dem Genom des *E.coli*-Stammes SURE® amplifiziert. Die PCR war erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen PCR-

Fragmente wurden mit *KpnI/PstI* geschnitten und in mit *KpnI/PstI* geschnittenes pHK662 (Vektoranteil) ligiert. Der Vektor pHK662 trägt eine Tetrazyklin-Resistenz-Gen-Kassette statt wie in den ATGA-Klonen vorhandene Ampicillin-Resistenz-Gen-Kassette. Somit können die BL21-Zellen mit beiden Vektoren sequenziell transformiert werden.

Von den drei oben geplanten Konstrukten konnten lediglich zwei erhalten werden. Dieses waren die Konstrukte „Dcm + Vsr“ und „Vsr alleine“. Das Konstrukt „Dcm alleine“ konnte nicht erhalten werden. Die Überexpression von Dcm in Abwesenheit von Vsr führt zur unspezifischen Methylierung und damit zu einer Erhöhung von C→T Übergängen (BANDARU *et al.* 1996). Hier konnte also bestätigt werden, dass Dcm ohne die dazugehörige Reparatur-Endonuklease ein starkes Mutagen ist, und zum Absterben der Zellen führt. Da BL21 fast alle Komponenten der Methylierungsabwehr enthält, ist die Etablierung von „Dcm alleine“ vermutlich zusätzlich erschwert.

Die so erhaltenen Stämme wurden bei „Dcm + Vsr“ pKF1 (vgl. Abbildung 69), und bei „Vsr alleine“ pKF2 (vgl. Abbildung 70) genannt. Sie wurden nun mit den ATGA-Konstrukten und als Kontrolle mit pUC19-DNA ringtransformiert (mit jeweils 100ng der DNA). Zusätzlich wurde eine Ringtransformation der erhaltenen Konstrukte in BL21, HB101 und SURE<sup>®</sup> durchgeführt (Tabelle 19). Die Transformationsansätze wurden im Falle von BL21, HB101 und SURE<sup>®</sup> auf Ampicillin-Platten ausgestrichen, bei pKF1 und pKF2 auf Ampicillin/Tetrazyklin/IPTG-Platten (100µg/ml Amp, 10µg/ml Tet, 1mM IPTG). Bei der Transformation der ATGA-Klone in pKF1 und pKF2 wurden zwei verschiedene Koloniegrößen beobachtet, kleine und große. Dieses Problem wird auch bei mit pHK662 vormethylierten Zellen gefunden. Bei den kleinen Zellen handelt es sich dabei meistens um Tetrazyklin-resistente Zellen (auch wenn sie auf Ampicillin ausplattiert werden), bei den großen um Zellen, die tatsächlich Ampicillin-resistent sind. Im Falle von pKF1 und pKF2 transformiert mit den ATGA-Vektoren sind die großen Zellen deswegen (mit hoher Wahrscheinlichkeit) die gesuchten Zellen. Bei der Bestimmung der Transformationsausbeute in Tabelle 19 werden daher nur die großen Zellen ausgezählt.

Weiterhin ist zu beachten, dass es sich bei den Zahlen bei pKF1 und pKF2 um Werte handelt, die bei der Ausplattierung des kompletten Transformationsansatzes erhalten worden sind, wohingegen bei den anderen Zellen immer nur 10% des Transformationsansatzes ausplattiert worden ist.

**Tabelle 19: Darstellung der Ergebnisse der Ringtransformation der erhaltenen ATGA-Varianten**

DNA	Bakterienstamm				
	BL21 <sup>°</sup>	HB101 <sup>°</sup>	SURE <sup>®</sup> <sup>°</sup>	pKF1*	pKF2*
	Ø	Ø	Ø	Ø große Kolonien	Ø große Kolonien
K+ (pUC19)	83	865	20	48	51
ATGA BI	483	907	46	67	94
ATGA CII	606	(1140)	283	145	92
ATGA EI	645	1895	284	173	148

<sup>°</sup> Mittelwert aus drei unterschiedlichen Ausplattierungen einer Ringtransformation (10% des Ansatzes)

\* Mittelwert aus drei unterschiedlichen Ringtransformationen mit vollständigem Ansatz

Werte in Klammern sind Mittelwerte aus nur zwei Versuchen, wenn die dritte Bestimmung extrem abweichende Werte ergab.

Wie in Tabelle 19 dargestellt lassen sich pKF1 und pKF2 deutlich schlechter mit ATGA-Vektoren transformieren als die anderen Stämme. Dies scheint ein typisches Phänomen bei BL21 zu sein. Wird dieser Stamm zum Beispiel mit pHK662 transformiert, so lässt er sich im Gegensatz zu mit pHK662 transformierten HB101-Zellen sehr schlecht mit weiteren Vektoren transformieren.

In Tabelle 20 ist die Transformationseffizienz der ATGA-Vektoren im Vergleich zu der Positivkontrolle (pUC19) zu finden. Sie wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz [\%]} = \frac{\text{Anzahl großer Kolonien bei Transformation eines ATGA-Vektors in einen Stamm}}{\text{Anzahl Kolonien bei Transformation von pUC19 in demselben Stamm}} \times 100$$

Ein Wert von 100% bedeutet, dass die Zellen mit diesem Konstrukt genauso gut wie mit pUC19 transformiert werden können, ein Wert über 100% bedeutet, dass die Zellen mit dem Konstrukt besser transformiert werden als mit pUC19.

**Tabelle 20: Transformationseffizienz im Vergleich zu pUC19.** Die Werte wurde aus der mittleren Anzahl großer Kolonien (vgl. Tabelle 19) mithilfe der oben dargestellten Formel berechnet.

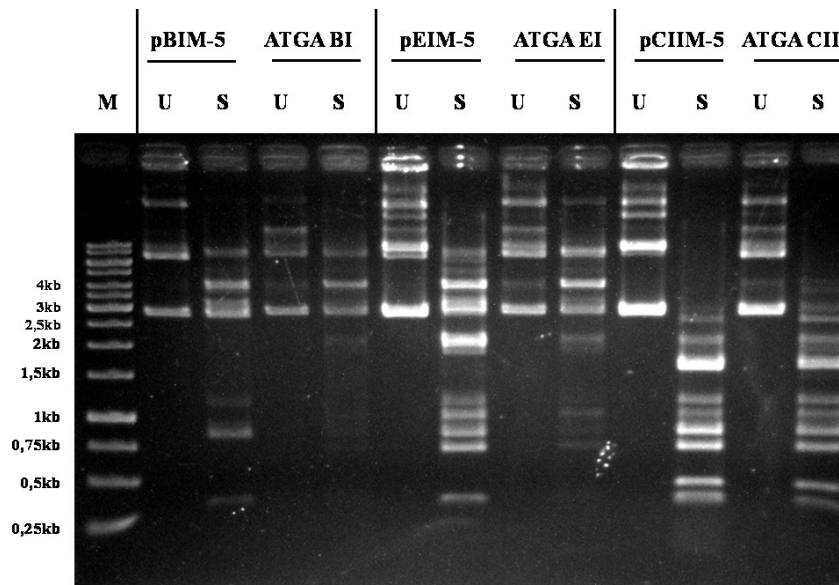
DNA	Bakterienstamm				
	BL21	HB101	SURE <sup>®</sup>	pKF1	pKF2
ATGA BI	580%	100%	230%	140%	180%
ATGA CII	730%	130%	1390%	300%	180%
ATGA EI	780%	220%	1400%	360%	290%

Der Vergleich zeigt, dass die Transformationseffizienz von ATGA-Vektoren bei SURE<sup>®</sup>-Zellen und bei BL21 höher als bei HB101-Zellen ist. Zudem waren die Kolonien auf LB-Agar-Platten nur sehr klein. Sie wuchsen in LB-Medium im Gegensatz zu den Kolonien von BL21 und SURE<sup>®</sup> nur sehr wenig an. Die aus SURE<sup>®</sup> und BL21 isolierten Plasmide waren einheitlich. Dies deutet darauf hin, dass lediglich die Etablierung der ATGA-Konstrukte als Ligase-Produkte in den Zellen schwierig ist. Eine nachfolgende Ringtransformation ist dagegen (zumindest bei BL21 und SURE<sup>®</sup>) ohne Probleme.

Vergleicht man die Transformationseffizienz der einzelnen ATGA-Vektoren in die verschiedenen Stämme miteinander, dann findet man, dass sich der Vektor ATGA EI in HB101, SURE<sup>®</sup> und BL21 am besten von den drei ATGA-Vektoren ringtransformieren lässt. Dies ist auch in pKF1 und pKF2 zu finden. Am schlechtesten zu transformieren ist der Vektor ATGA BI. Der Vektor ATGA CII kann entweder gleich gut wie ATGA EI kloniert werden (BL21, SURE<sup>®</sup>, pKF1) oder so gut (oder schlecht) wie ATGA BI (HB101 und pKF2). Es scheint also, dass die Komplementation von BL21 mit *dcm/vsr* (=pKF1) keine Auswirkung auf die Ringtransformation von ATGA-Klonen besitzt, die Komplementation mit *vsr* (pKF2) aber sehr wohl. In diesem Fall ist die Ringtransformation von ATGA CII schlechter als in BL21.

#### 4.1.3 Methylierungsaktivität ATGA-Klone

Nachdem die Aktivität der Methyltransferasen *M.HgiBI* und *M.HgiEI* grundsätzlich bereits in der Diplomarbeit ermittelt worden ist, sollten hier die ATGA-Konstrukte von *M.HgiBI*, *M.HgiCII* und *M.HgiEI* genauso untersucht werden. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden isoliert und mit *Sau96I* verdaut. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Zu beachten ist, dass die *Sau96I*-Erkennung (GGNCC) die *AvaII*-Erkennung (GGWCC) mit einschließt. Sobald die zu untersuchende Methyltransferase auch die GGSCC-Sequenz erkennt, sollte aus dem Spaltungsmuster ableitbar sein, bis zu welchem Grad die Methylierung an der GGSCC-Sequenz stattfindet.



**Abbildung 15: Einfluss der Kopplung der Methyltransferase an den vorlaufenden LacZ<sub>a</sub>-Leserahmen.** Entsprechend Tabelle 17 wird jeweils ein Expressionspaar derselben Methyltransferase verglichen. Dabei bedeutet -5, dass das ATG-Startcodon 11 Nukleotide (zwischen letzter Aminosäure LacZ<sub>a</sub> und ATG MTase sind 4 2/3 Codons – 14 Nukleotide ≈ 5 Codons) hinter dem Stopp-Codon des LacZ<sub>a</sub>-Leserahmens liegt. U= Unverdaut, S= Nach Zugabe von *Sau96I*, M= 1kb ladder von Fermentas.

Durch das Fehlen kleiner Banden zeigt sich in Abbildung 15, dass die ATGA-Klone von *M.HgiBI* und *M.HgiEI* im Vergleich zu pBIM-5 bzw. pEIM-5 einen stärkeren Schutz gegen *Sau96I* gewähren. Zwischen pCIIM-5 und ATGA CII kann man diesen Unterschied nicht feststellen. Wenn überhaupt, so scheint, dass ATGA CII ein wenig häufiger mit *Sau96I* geschnitten wird.

## 4.2 Zusätzliche Nebenaktivitäten Methyltransferasen

In der Diplomarbeit wurde ermittelt, dass *M.HgiBI* und *M.HgiEI* zusätzlich zu der wildtypischen Spezifität GGWCC auch eine GGSCC-Spezifität besitzen. In dieser Arbeit sollte nun ermittelt werden, ob diese Methyltransferasen weitere Spezifitäten besitzen. Hinweise dazu kamen aus Vorarbeiten von Jens KRIESE. Um das Problem systematisch anzugehen, wurde ein Vektorsystem, entworfen, das alle denkbaren Varianten der wildtypischen Erkennungssequenzen GGACC und GGTC C enthalten sollten. Entsprechend dem Schema in Abbildung 16 wurden zwei vergleichsweise lange Oligonukleotide entworfen und jeweils in ein Expressionsplasmid für die zu untersuchende Methyltransferase eingebracht. Auf Grund der Redundanz der theoretisch möglichen Varianten verringert sich die Zahl der Kombinationen, die in den Oligonukleotiden berücksichtigt werden müssen. In Abbildung 16 sind die doppelten Sequenzen mit der gleichen Farbe markiert.



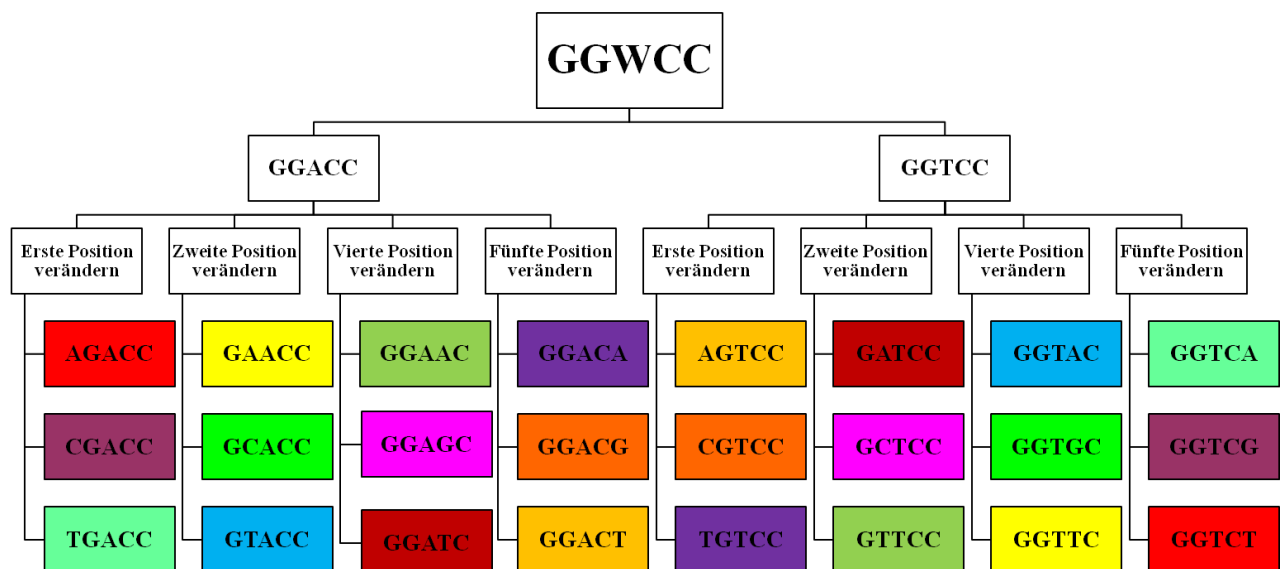


Abbildung 16: Darstellung der möglichen Sequenzen nach Änderung der Sequenzen GGACC und GGTCC. Die in gleichen Farben markierten Sequenzen sind identisch (z.B. Gegenstrang gleich wie die Sequenz).

Auch nach systematischer Reduktion ergaben sich so viele Varianten, dass es aus praktischen Gründen geboten war, zwei Oligonukleotidpaare zu synthetisieren (vgl. Tabelle 9). Die Oligonukleotide wurden zunächst phosphoryliert und dann paarweise hybridisiert. Die beiden entstehenden doppelsträngigen Oligomere wurden entweder BamHI-Linker (*Bam*HI-Schnittstelle als Erkennungsmerkmal) oder XbaI-Linker (*Xba*I-Schnittstelle als Erkennungsmerkmal) genannt. Sie sind in Abbildung 17 dargestellt.

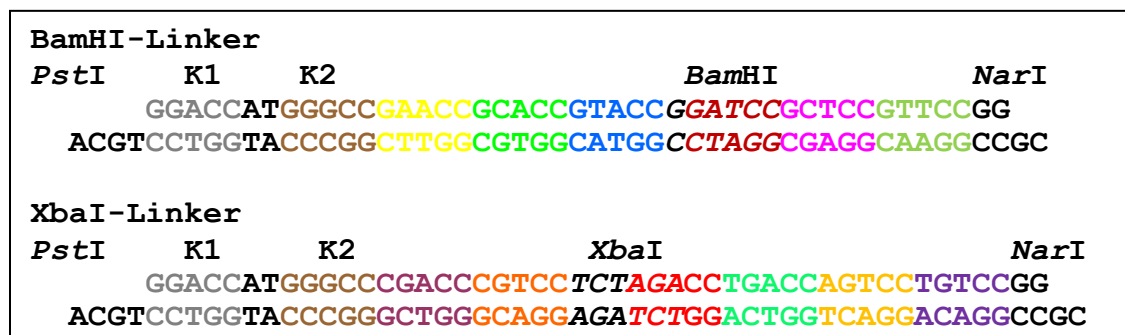


Abbildung 17: Oligomere für die Bestimmung der Methyltransferase-Spezifität. K1, K2 = Kontrollsequenzen (K1= GGWCC= *Ava*II, K2= GGSCC), *Bam*HI/*Xba*I= Erkennungsmerkmal der einzelnen Linker. In unterschiedlichen Farben markiert sind die aus Abbildung 16 übernommenen Sequenzen zur Bestimmung möglicher zusätzlicher Spezifitäten.

Zusätzlich zu den möglichen Nebenaktivitäts-Sequenzen sind in die Vektoren auch die Sequenzen für die Wildtyp-Aktivität (GGWCC) und die gefundene Nebenaktivität (GGSCC) als Kontrollsequenzen eingebaut (bezeichnet als K1 im Falle von GGWCC und als K2 im Falle von GGSCC). Im XbaI-Linker überlappen zwei GGSCC-Sequenzen. Dies führt wie später beobachtet zu einer schwächeren Methylierung dieser Kontrollsequenz im Vergleich zum BamHI-Linker. Die hybridisierten Oligomere besitzen an einem Ende einen *Pst*I-Überhang, an dem anderen Ende

einen *NarI*-Überhang. Dies ermöglicht den gerichteten Einbau in Vektoren, welche eine *PstI* und *NarI* Schnittstelle besitzen. Alle Methyltransferase-Vektoren, die bis dato von Denis RICHTER (Masterarbeit 2008) bzw. in der eigenen Diplomarbeit hergestellt wurden, besitzen diese Schnittstellen. Sie wurden stets mit *PstI* und *NarI* präpariert und mit dem BamHI- bzw. XbaI-Linker ligiert. Der Vorgang der Ligation mit dem BamHI-Linker ist in Abbildung 18 für pBIM-5 exemplarisch dargestellt.

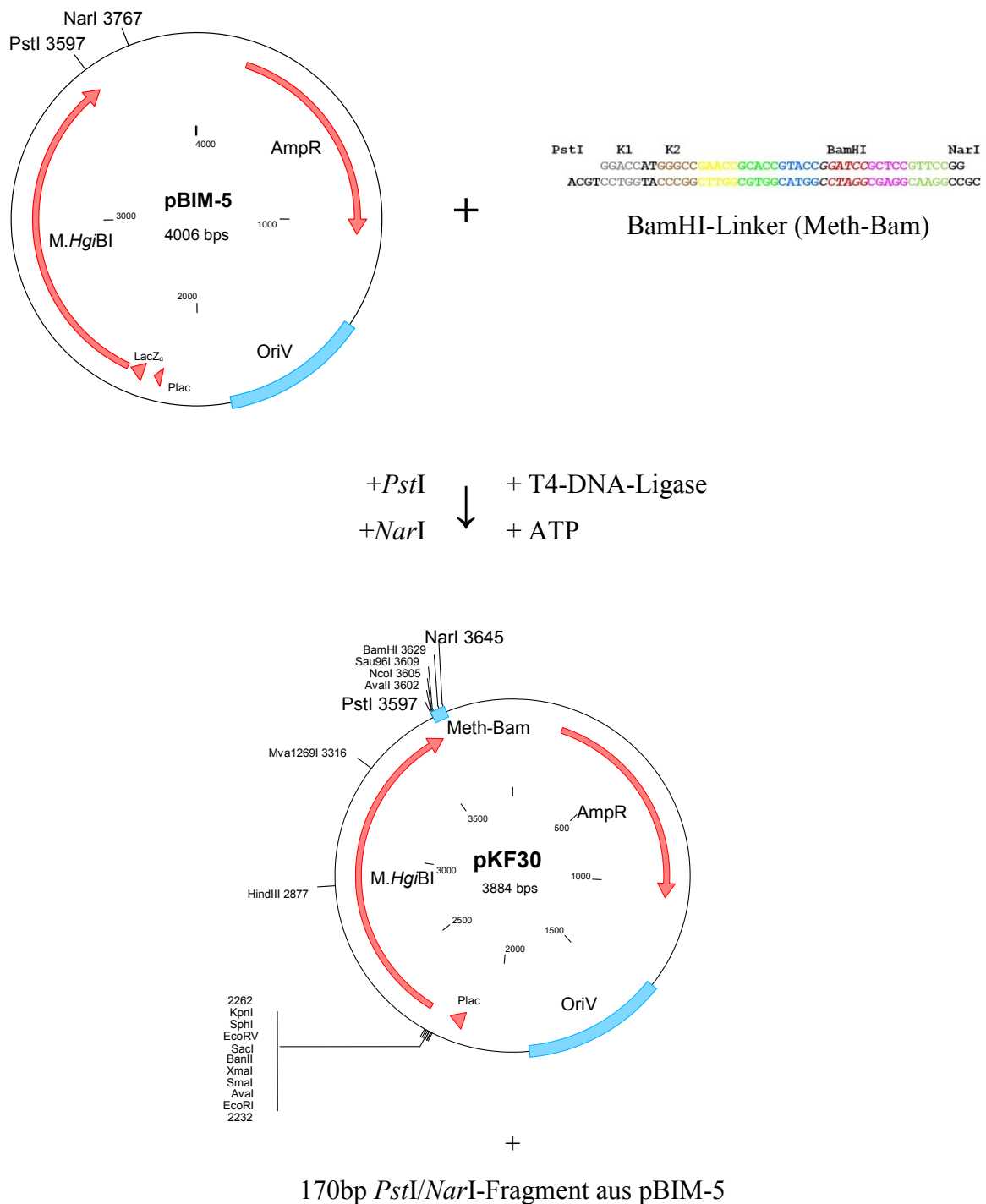


Abbildung 18: Herstellung des Vektors pKF30. Meth-Bam= BamHI-Linker

### 4.2.1 Wildtyp-Methyltransferasen

Die Ligation mit den Linkern war im Fall von *M.HgiBI* relativ problemlos. Die resultierenden Plasmide wurden pKF30 (vgl. Abbildung 18) und pKF31 (XbaI-Linker, vgl. Abbildung 59 auf Seite 144) genannt.

Bei *M.HgiEI* und *M.HgiCII* gelang die Herstellung der entsprechenden Vektoren allerdings nicht auf Anhieb. Entweder wurde gar kein Oligonukleotid eingebaut, oder es wurden gleich mehrere eingebaut. Deshalb wurde eine andere Strategie gewählt. Zunächst sollte aus pKF30 und pKF31 mit *PstI* und *SspI* der Linker zusammen mit einem kurzen Vektor-Anteil ausgeschnitten werden und dann in die Vektoren mit *M.HgiEI* und *M.HgiCII* eingefügt werden. Auf diesem Weg sollte das Problem der Ligation eines großen Fragmentes mit einem kleinen Fragment umgangen werden. Der Aufbau des Linker verhinderte diese Strategie, weil die *PstI*-Schnittstelle mit der Kontroll-Methylierungs-Position (GGWCC, *AvaII*) überlappt. Aufgrund der Methylierung der *AvaII*-Sequenz konnte die *PstI*-Schnittstelle nicht geschnitten werden.

Für eine alternative Strategie wurde bei den beiden Plasmiden pKF30 und pKF31 jeweils das Methyltransferase-Gen mit *HindIII* aufgeschnitten und dann über Klenow-Polymerase aufgefüllt (vgl. Abbildung 19). Dadurch wird das Leseraster des Methyltransferase-Gens verschoben, so dass direkt neben der (ehemaligen) *HindIII*-Schnittstelle ein Stopp-Codon entsteht (vgl. Abbildung 19). Die resultierenden Vektoren wurden pKF30H und pKF31H benannt und sind auf Seite 113 und 144 dargestellt.

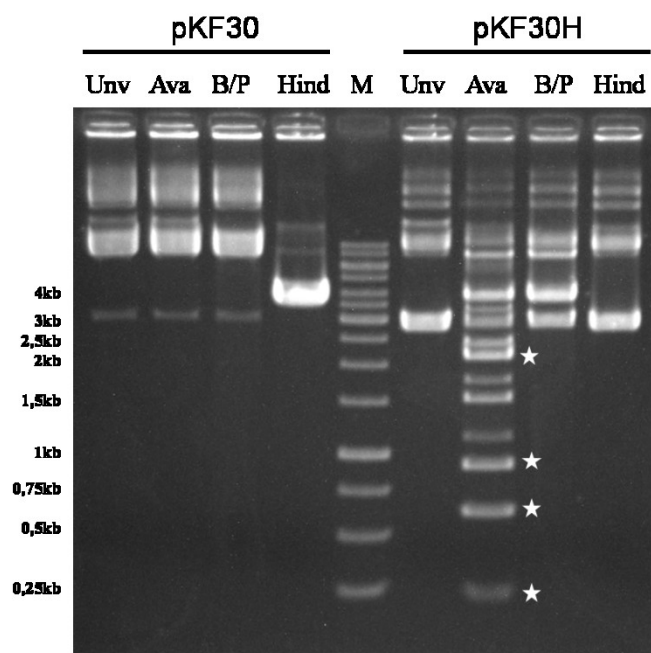
	<i>HindIII</i> geschnitten und aufgefüllt	
Aminosäuresequenz:	.....	ProGluThrLysLeuGlu.....
pKF30/pKF31	AATCTTGAAGTACCAGAACTA	AGCTTGAATCAATTCCAATTCAGCGCAATTTATT
pKF30H/pKF31H	AATCTTGAAGTACCAGAACTA	AAGCTAGCTTGAATCAATTCCAATTCAGCGCAATTTATT
Aminosäuresequenz:	.....	ProGluThrLysLeuSer***

**Abbildung 19: Ergebnis des Schneidens von pKF30 bzw. pKF31 mit *HindIII* und nachfolgendes Auffüllen mit Klenow-Polymerase.** \*\*\*= Stoppcodon, dunkelgrau die ursprüngliche *HindIII*-Schnittstelle, hellgrau die aufgefüllte Schnittstelle.

Jetzt sollte die Funktion der Methyltransferase zerstört und der Vektor mit *PstI* zu schneiden sein. In einem weiteren Schritt sollte mit Hilfe von *PstI* und *EcoRI* das defekte *M.HgiBI*-Gen herausgeschnitten und durch die Methyltransferase-Gene von *M.HgiEI* oder *M.HgiCII* ersetzt werden.

Bei der Konstruktion der Vektoren mit der defekten Methyltransferase zeigte sich, dass das resultierende Methyltransferase-Fragment immer noch als Methyltransferase aktiv ist. Abbildung 20 zeigt, dass pKF30 gar nicht und pKF30H nicht komplett mit *AvaII* verdaut werden kann (vgl. Tabelle 21). Zusätzlich zu den Banden, welche bei einem vollständigen *AvaII*-Verdau von

pKF30H zu erwarten sind, lassen sich zahlreiche Zwischenbanden finden. Das bedeutet, dass die entsprechende Methyltransferase entweder reduziert exprimiert wird oder an spezifischer Aktivität verloren hat. Grundsätzlich muss sie aber weiterhin funktionsfähig geblieben sein.



**Abbildung 20: Vergleich der Methylierungsaktivitäten von pKF30 und pKF30H.** Abkürzungen: Unv= unverdaute Probe, Ava= mit *AvaII* verdaute Probe, B/P= Verdau mit *BsrGI* und *PstI*, Hind= Verdau mit *HindIII*. Mit einem Stern markiert sind solche Banden, die für einen vollständigen Verdau von pKF30 bzw. pKF30H erwartet wurden. .

**Tabelle 21: Darstellung der Bandengrößen nach *AvaII*-Verdau von ungeschütztem pKF30 und pKF30H**

Erwartete Bandengrößen	
pKF30	pKF30H
2151	2155
906	906
605	605
222	222

Bei pKF31H konnte das gleiche Ergebnis beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diesem Phänomen der Aktivität von Fragmenten aus *M.HgiBI*, wenn es in zwei Stücken exprimiert wird, wird in Abschnitt 4.6 gesondert nachgegangen.

Trotz dieser partiellen *AvaII*-Aktivität war es möglich, pKF30H bzw. pKF31H mit *EcoRI* und *PstI* zu schneiden. Das große Fragment wurde isoliert und mit dem kleinen *PstI/EcoRI*-Fragment aus pEIM-5 und pCIIM-5 kombiniert. So war es möglich, BamHI- und XbaI-Linker mit den Methyltransferasen *M.HgiEI* und *M.HgiBI* zu kombinieren. Die Benennung der hierbei resultierenden Vektoren ist in Tabelle 22 zu finden.

**Tabelle 22: Benennung der aus *M.HgiEI* und *M.HgiCII* resultierenden Vektoren**

Benennung	Methyltransferase	Linker	Darstellung
pEIM-5 Bam	<i>M.HgiEI</i>	BamHI	Abbildung 21
pEIM-5 Xba	<i>M.HgiEI</i>	XbaI	Abbildung 65
pCIIM-5 Bam	<i>M.HgiCII</i>	BamHI	Abbildung 67
pCIIM-5 Xba	<i>M.HgiCII</i>	XbaI	Abbildung 68

Mit den so erhaltenen Vektoren, nämlich pKF30, pKF31, pEIM-5 Bam, pEIM-5 Xba, pCIIM-5 Bam, pCIIM-5 Xba, pKF30H und pKF31H wurde nun jeweils zweimal die Bisulfit-Reaktion durchgeführt; d.h. es wurden zwei verschiedene Minipreps desselben Klons untersucht. Aus der so behandelten DNA wurde entweder ein 180bp großes Fragment (im Falle von *M.HgiEI* bzw. *M.HgiBI*) oder ein 300bp großes Fragment (im Falle von *M.HgiCII*) mit den in Tabelle 10 aufgeführten Primern amplifiziert. Die entstehenden Fragmente wurden mit beiden Primern sequenziert.

Die aus der Verwendung des reversen Primers Methyl-Z resultierenden Sequenzen waren am besten zu lesen. Deshalb werden in Tabelle 23 die Ergebnisse unter Verwendung des Primers Methyl-Z dargestellt. Es wird nur eine der zwei Bisulfit-Sequenzen dargestellt. Sind allerdings zwischen den beiden Sequenzen Unterschiede zu beobachten, so werden beide Sequenzen dargestellt. Tabelle 23 belegt für die Wildtyp-Methyltransferasen *M.HgiEI* und *M.HgiBI* eine deutliche Methylierung an der Position GGGCC und GGACC. Bei *M.HgiCII* ist die Methylierung an der Position GGGCC nicht zu beobachten.

Vergleicht man die Methylierungsaktivität von *M.HgiEI* und *M.HgiBI* miteinander, so stellt man fest, dass *M.HgiEI* tatsächlich weitaus stärker die Sequenz GGWCC (und auch GGSCC) als *M.HgiBI* methyliert. Damit ist die Hypothese aus Kapitel 1.7 bestätigt, während die Ergebnisse aus der eigenen Diplomarbeit widerlegt sind.

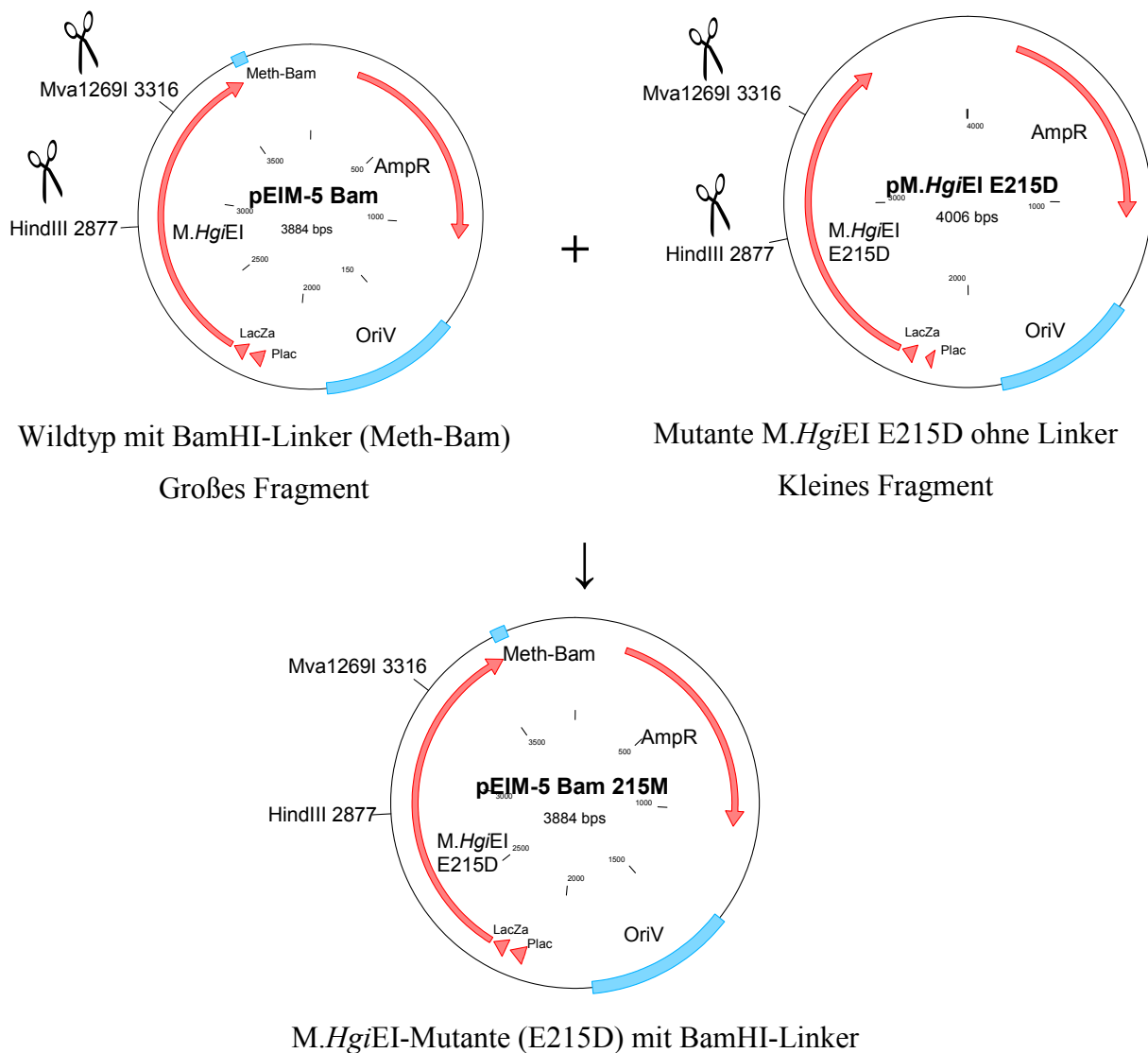
Erstaunlicherweise konnten bei den *HindIII*-Deletions-Varianten von *M.HgiBI* an zwei Positionen Nebenaktivitäten beobachtet werden, die in Tabelle 23 jeweils mit einem blauen Pfeil markiert sind. Die methylierten Sequenz ist an der ersten Position GAACmC und an der zweiten Position CGCAmC. Bisher unverstanden ist die Beobachtung, dass bei demselben Vektor zwei unterschiedliche Nebenaktivitäten gefunden werden. Die möglicherweise unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Zellen wurden wie üblich nicht protokolliert.

**Tabelle 23 (folgende Seite): Ergebnis der Bisulfit-Sequenzierung an den Wildtyp-Methyltransferasen.** Die Sequenzen BamHI und XbaI sind die Sequenzen der Linker vor der Bisulfit-Reaktion. BamHI Bs und XbaI Bs sind die Referenzsequenzen für die folgende Analyse nach Bisulfit-Reaktion. Blaue Pfeile deuten zusätzliche Nebenaktivitäten an. Die Sequenzen sind zum besseren Verständnis umgedreht und komplementär dargestellt (Programm GENTle). Weitere Erläuterungen siehe Text.

Vektor	Sequenzier-Ergebnis mit dem Primer Methyl-Z
BamHI	CTGCAGGACCATGGGCCGAACCGCACC GTACCGGATCCGCTCCGTTCCGGCGCC
BamHI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTGAATTGTATTGTATTGGATTGTTTTGTTTTGGTGT
XbaI	CTGCAGGACCATGGGCCCCGACCGTCCTCTAGACCTGACCAGTCCTGTCCGGCGCC
XbaI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTTGATTGTTTTTTAGATTGATTAGTTTTGTTTGGTGT
pKF30 (2) (pBIM-5 + Bam-Linker)	<p>TTGTAGGCATC ATGGGT C G A A TTGTATTGTATTGG ATT TG TTTG TTTG GTGT T</p>
pKF31 (2) (pBIM-5 + Xba-Linker)	<p>TTGTAGGATC ATGGGT C TG A TTGT TTTT TAG ATT TG A TTAG TTTG TTTG GTGT T</p>
pEIM-5 Bam (2)	<p>TTGTAGGNATCCNTGGGT C G A A TTGTATTGTATTGG ATT TG TTTG TTTG GTGT T</p>
pEIM-5 Xba (2)	<p>TTGTAGGCATC NTGGGT C NG A TTGT TTTT TAGNATTG ATTAGTT TTTG TTTG GTGT T</p>
pCIIM-5 Bam (2)	<p>TTGTAGGATC NTGGGT TG A A TTGTATTGTATTGG ATT TG TTTG TTTG GTGT T</p>
pCIIM-5 Xba (2)	<p>TTGNAGGATC NTGGGT T TG A TTGT TTTT TAG ATTG A TTAG TTTG TTTG GTGT T</p>
pKF30H (1)	<p>TTGTAGGNATC NTGGGT TG A A T NGTATTGTATTGG ATT TG TTTG TTTG GTGT T</p>
pKF30H (2)	<p>TTGTAGGATNNTGGGT TG A A TTGTAC TGA TTGG ATT TG TTTG TTTG GTGT T</p>
pKF31H (2)	<p>TTGTAGGCATC NTGGGT TG A A TTGT TTTT TAG ATT TG A TTAG TTTG TTTG GTGT T</p>

#### 4.2.2 Nebenaktivität der Methyltransferase-Mutanten aus der Diplomarbeit

Zusätzlich zu den Wildtyp-Methyltransferasen wurden auch die in der eigenen Diplomarbeit dargestellten Punkt-Mutanten und Doppel-Punkt-Mutanten auf eventuelle Nebenaktivitäten überprüft. Die entsprechenden Vektoren wurden mit den jeweiligen Plasmiden per Fragmentaustausch rekombiniert (vgl. Abbildung 21 für ein repräsentatives Beispiel).



**Abbildung 21: Herstellung des Vektors pEIM-5 Bam 215M.** Kombiniert wurde das große *HindIII*/*Mva1269I*-Fragment aus pEIM-5 Bam mit dem kleinen *HindIII*/*Mva1269I*-Fragment aus pM.*HgiEI* E215D. So konnte die Mutation Asparaginsäure in Position 215 nach Glutaminsäure erfolgreich in den Bisulfit-Analyse-Vektor umgesetzt werden.

Unter Verwendung dieser Fragmentaustauschtechnik wurden pKF30, pKF31, pEIM-5 Bam und pEIM-5 Xba mit den in der Diplomarbeit hergestellten Punkt-Mutationen von *M.HgiBI* bzw. *M.HgiEI* kombiniert (vgl. Anhang Seite 145 und 147). Die daraus resultierenden Plasmide sind in Tabelle 24 aufgeführt.

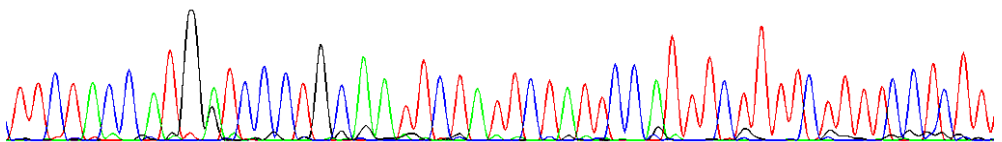
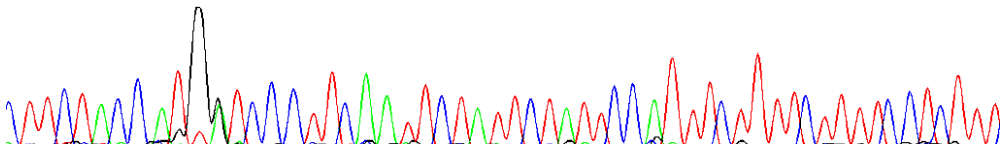
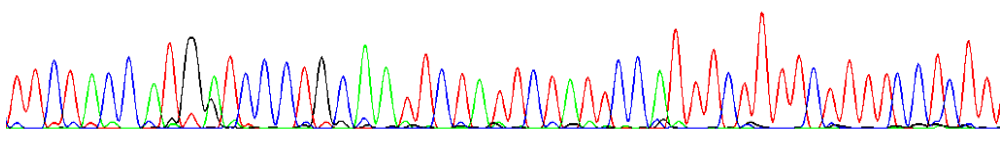
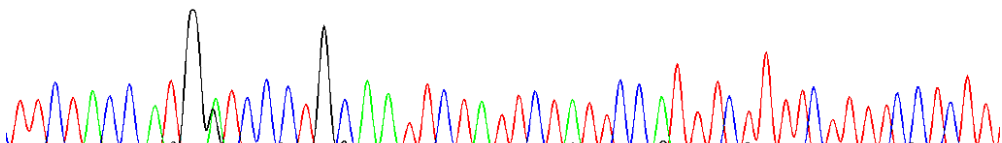
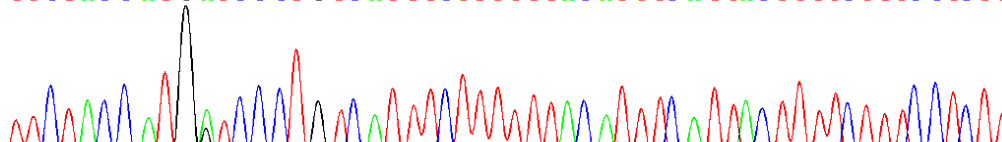
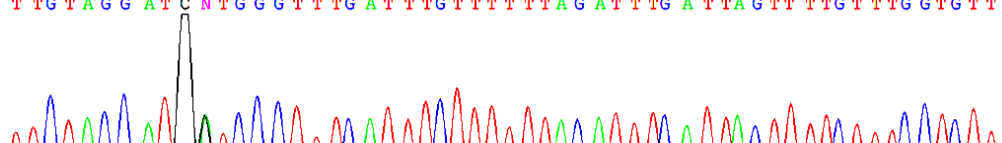
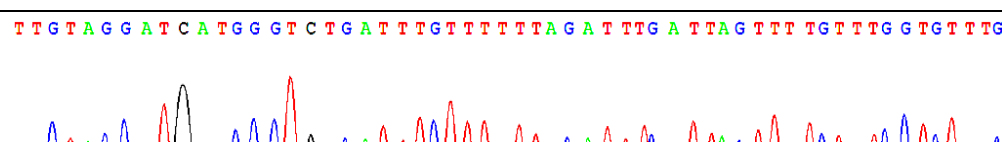
**Tabelle 24: Benennung der BamHI/XbaI-Plasmide der Mutanten aus der Diplomarbeit.**

<b>MTase</b>	<b>Mutation</b>	<b>Linker</b>	<b>Benennung</b>
M. <i>Hgi</i> BI	D215E	BamHI	pKF30 215M
	A289V G290D		pKF30 289/290M
	D215E	XbaI	pKF31 215M
	A289V G290D		pKF31 289/290M
M. <i>Hgi</i> EI	E215D	BamHI	pEIM-5 Bam 215M
	V289A		pEIM-5 Bam 289M
	D290G		pEIM-5 Bam 290M
	V289A D290G		pEIM-5 Bam 289/290M
	E215D	XbaI	pEIM-5 Xba 215M
	V289A		pEIM-5 Xba 289M
	D290G		pEIM-5 Xba 290M
	V289A D290G		pEIM-5 Xba 289/290M

Mit diesen zwölf Plasmiden wurde wie oben beschrieben jeweils zweimal die Bisulfit-Reaktion durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Tabelle 25 bis Tabelle 27 dargestellt. Wieder wird pro Plasmid nur ein Ergebnis, bei Abweichung beide Ergebnisse dargestellt.



**Tabelle 25: Ergebnis der Bisulfit-Reaktion bei den Mutanten von *M.HgiBI* aus der Diplomarbeit.** Die Sequenzen BamHI und XbaI sind die Sequenzen der Linker vor der Bisulfit-Reaktion. BamHI Bs und XbaI Bs sind die Referenzsequenzen für die folgende Analyse nach Bisulfit-Reaktion. Die Sequenzen sind zum besseren Verständnis umgedreht und komplementär dargestellt (Programm GENTle). Zusätzlich zu den Mutanten sind die Wildtypen mit aufgeführt. Weitere Erläuterungen siehe Text auf Seite 64.

Vektor	Sequenzier-Ergebnis mit Primer Methyl-Z
BamHI	CTGCAGGACCATGGGCCGAACCGCACCGTACCGGATCCGCTCCGTTCGGGCGCC
BamHI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTGAATTGTATTGTATTGGATTGTTTTGTTTTGGTGTT
pKF30 WT (2)	<p>T T G T A G G C A T C A T G G G T C G A A T T G T A T T G T A T T G G A T T T G T T T G T T T G G T G T T</p> 
pKF30 215M (1)	<p>G T T G T A G G C A T C N T G G G T T G A A N T T G T A T T G T A T T G G A T T T G T T T G T T T G G T G T T T</p> 
pKF30 289/290M (1)	<p>T T G T A G G A T C A T G G G T C G A A T T G T A T T G T A T T G G A T T T G T T T G T T T G G T G T T</p> 
pKF30 289/290M (2)	<p>T T G T A G G A T C A T G G G T C G A A T T G T A T T G T A T T G G A T T T G T T T G T T T G G T G T T</p> 
XbaI	CTGCAGGACCATGGGCCCCGACCGTCCTCTAGACCTGACCAGTCCTGTCCGGGCGCC
XbaI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTTGATTTGTTTTTTAGATTGATTAGTTTTGTTTGGTGTT
pKF31 WT (2)	<p>T T G T A G G A T C A T G G G T C T G A T T T G T T T T T A G A T T T G A T T A G T T T T G T T T G G T G T T</p> 
pKF31 215M (1)	<p>T T G T A G G A T C N T G G G T T T G A T T T G T T T T T A G A T T T G A T T A G T T T T G T T T G G T G T T T</p> 
pKF31 289/290M (1)	<p>T T G T A G G A T C A T G G G T C T G A T T T G T T T T T A G A T T T G A T T A G T T T T G T T T G G T G T T T</p> 

**Tabelle 26: Ergebnis der Bisulfit-Reaktion bei den Mutanten von *M.HgiEI* aus der Diplomarbeit (1).** Die Sequenz BamHI ist die Sequenz des Linkers vor der Bisulfit-Reaktion. BamHI Bs ist die Referenzsequenz für die folgende Analyse nach Bisulfit-Reaktion. Die Sequenzen sind zum besseren Verständnis umgedreht und komplementär dargestellt (Programm GENTle). Zusätzlich zu den Mutanten sind die Wildtypen mit aufgeführt. Weitere Erläuterungen siehe Text auf Seite 64.

Vektor	Sequenzier-Ergebnis mit Primer Methyl-Z
BamHI	CTGCAGGACCATGGGCCGAACCGCACCGTACCGGATCCGCTCCGTTCCGGCGCC
BamHI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTGAATTGTATTGTATTGGATTTGTTTTGTTTTGGTGTT
pEIM-5 Bam (2)	
pEIM-5 Bam 215M (1)	
pEIM-5 Bam 289M (1)	
pEIM-5 Bam 290M (1)	
pEIM-5 Bam 289/290M (1)	

**Tabelle 27: Ergebnis der Bisulfit-Reaktion bei den Mutanten von *M.HgiEI* aus der Diplomarbeit (2).** Die Sequenz XbaI ist die Sequenz des Linkers vor der Bisulfit-Reaktion. XbaI Bs ist die Referenzsequenz für die folgende Analyse nach Bisulfit-Reaktion. Die Sequenzen sind zum besseren Verständnis umgedreht und komplementär dargestellt (Programm GENTle). Zusätzlich zu den Mutanten sind die Wildtypen mit aufgeführt. Weitere Erläuterungen siehe Text auf Seite 64.

Vektor	Sequenzier-Ergebnis mit Primer Methyl-Z
XbaI	CTGCAGGACCATGGGCCCCGACCCGTCCTCTAGACCTGACCAGTCCTGTCCGGCGCC
XbaI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTTGATTTGTTTTTAGATTGATTAGTTTTGTTTGGTGT
pEIM-5 Xba (2)	
pEIM-5 Xba 215M (1)	
pEIM-5 Xba 289M (1)	
pEIM-5 Xba 290M (1)	
pEIM-5 Xba 289/290M (1)	

Wie in den Tabelle 25 bis Tabelle 27 dargestellt, konnte bei keiner der Punkt-Mutanten von *M.HgiBI* bzw. *M.HgiEI* eine zusätzliche Nebenaktivität außer GGSCC beobachtet werden. Weiterhin konnten die in der Diplomarbeit erhaltenen Ergebnisse wiederholt werden: Tabelle 25 zeigt für die Mutante von *M.HgiBI* an Position 215 keine GGSCC-Aktivität, was auch in der Diplomarbeit der Fall gewesen ist. Weiterhin zeigen alle *M.HgiEI*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine geringere GGWCC und GGSCC-Methylierung. Dies entspricht ebenfalls den in der Diplomarbeit erhaltenen Ergebnissen.

### 4.2.3 Nebenaktivität neuer Methyltransferase-Mutanten

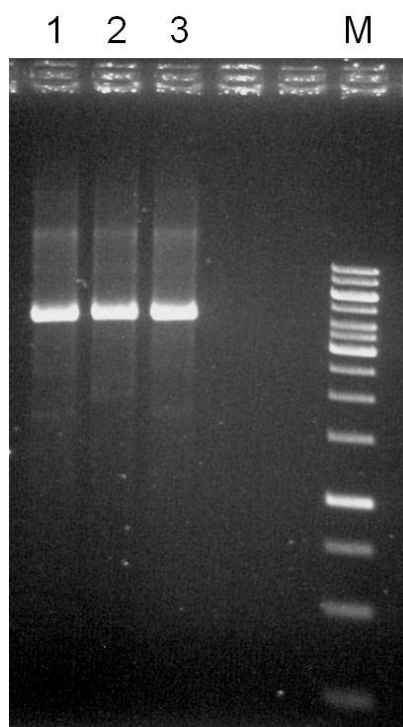
Zusätzlich zu den in 4.2.2 dargestellten Methyltransferase-Mutanten sollten in dieser Arbeit einige später auch in Abschnitt 4.4.1 verwendeten Methyltransferase-Varianten hergestellt und auf Nebenaktivität hin untersucht werden. Bei diesen neuen Mutanten handelt es sich um Doppel- und Tripel-Mutanten, die mit Hilfe der sogenannten inversen PCR (vgl. Abschnitt 3.5.2) hergestellt wurden. Sie sind in Tabelle 28 gelistet.

**Tabelle 28: Doppel- und Tripel- Mutanten von *M.HgiEI*.** Genannt sind die verwendeten Ausgangsplasmide und die bei der inversen PCR verwendeten Primer.

Ausgangsplasmid*	Primer (vgl. Tabelle 5)	Methyltransferase-Mutante	Bezeichnung Mutante
pM. <i>HgiEI</i> V289A	EI215BIR, EI215BIF	M. <i>HgiEI</i> E215D V289A	M. <i>HgiEI</i> E215D V289A
pM. <i>HgiEI</i> E215D	EI290BIR, EI289BIF	M. <i>HgiEI</i> E215D D290G	M. <i>HgiEI</i> E215D D290G
pM. <i>HgiEI</i> V289A D290G	EI215BIR, EI215BIF	M. <i>HgiEI</i> E215D V289A D290G	M. <i>HgiEI</i> E215D V289A D290G

\* Die hier verwendeten Ausgangsplasmide basieren auf dem in dieser Arbeit hergestellten Vektor pEIM-5.

Die Herstellung der Mutanten wurde durch Mutagenese über inverse PCR mit den in Tabelle 5 dargestellten Primern erreicht. Als DNA-templates für die PCR wurden die in Tabelle 28 dargestellten Einzel- bzw. Doppelmутanten von *M.HgiEI* verwendet. Abbildung 22 zeigt die erfolgreiche inverse PCR. Die PCR-Produkte wurden mit sich selbst ligiert, und in SURE®-Zellen transformiert.

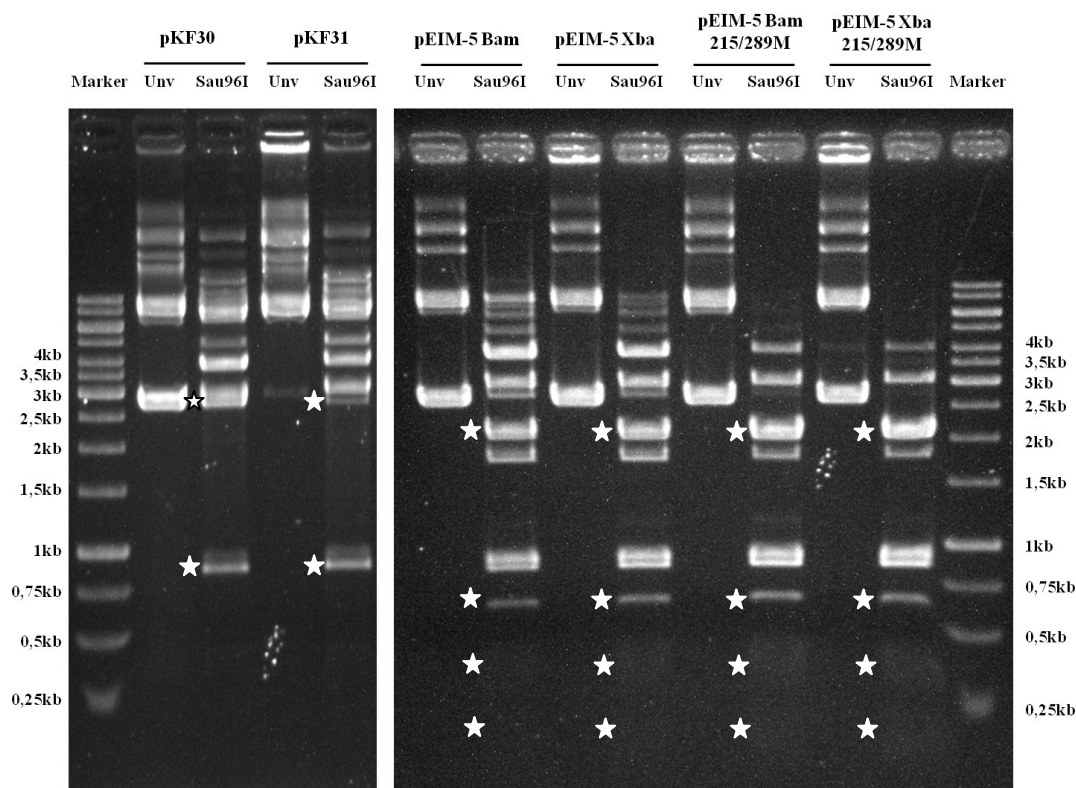


Hierbei zeigte es sich, dass der *E.coli*-Stamm SURE® nicht zuverlässig eingesetzt werden kann. So konnte die Mutante *M.HgiEI* E215D V289A nur mit einer zusätzlichen, ungewollten Mutation isoliert werden (Position 316, F→S).

Diese veränderte Mutante wurde trotzdem mit dem XbaI- und dem BamHI-Linker versehen. Die resultierenden Vektoren wurden pEIM-5 Xba 215/289M und pEIM-5 Bam 215/289M genannt und dann mit *Sau96I* verdaut.

**Abbildung 22: Ergebnis der inversen PCR für die Herstellung der Mutanten *M.HgiEI* E215D V289A (1), *M.HgiEI* E215D D290G (2) und *M.HgiEI* E215D V289A D290G (3). M= Marker**

Wie man in Abbildung 23 sehen kann, führte die zusätzliche Mutation im Vergleich zu pEIM-5 Bam und pEIM-5 Xba lediglich zu einer geringfügig reduzierten *Sau96I*-Aktivität. Der Einfluss der ungewollten Mutation ist offenbar nicht erheblich, so dass auf die Herstellung der richtigen Mutante an dieser Stelle verzichtet wurde. In Tabelle 29 sind die Fragmente, die ohne Schutz der Plasmide vor *Sau96I* entstehen würde, gelistet.



**Abbildung 23:** Verdau der erhaltenen *M.HgiEI* E215D V289A-Vektoren mit *Sau96I* (Bam/Xba). Im Vergleich dazu ist der Verdau von pEIM-5 Bam, pEIM-5 Xba, pKF30 und pKF31 aufgeführt. Mit einem Stern markiert sind Banden, die bei einem vollständigen Verdau mit *Sau96I* und gleichzeitigem vollständigen *AvaII*-Schutz vorhanden sein sollten. Unv= Unverdaute Probe, *Sau96I*= Verdau mit *Sau96I*, Marker: 1kb ladder von Fermentas

**Tabelle 29:** Liste der zu erwartende Banden bei einem Verdau von pKF30, pKF31, pEIM-5 Bam und pEIM-5 Xba mit *Sau96I* bei vollständigem *AvaII*-Schutz. In Klammern sind die Gesamtgrößen der verwendeten Plasmide dargestellt. Die Plasmide pEIM-5 Bam und pEIM-5 Xba unterscheiden sich von pEIM-5 Bam 215/289M und pEIM-5 Bam 215/289M nicht in der Größe der entstehenden Fragmente.

	pKF30 (3884bp)	pKF31 (3886bp)	pEIM-5 Bam (3884bp)	pEIM-5 Xba (3886bp)
Entstehende Fragmente	2667	2667	2055	2055
	855	855	855	855
	285	284	612	612
	79	79	285	284
		1	79	79
				1

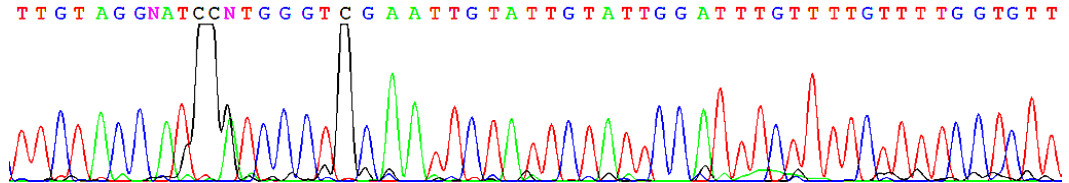
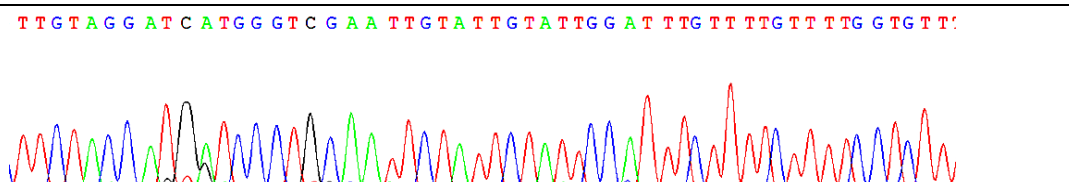
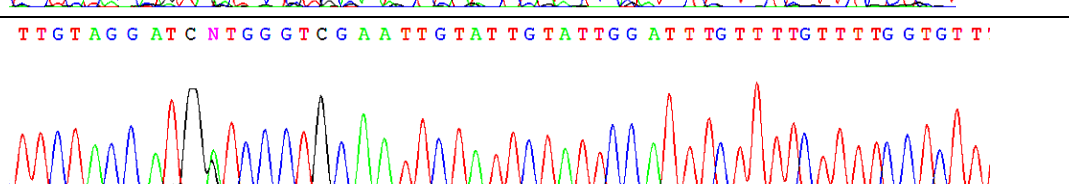
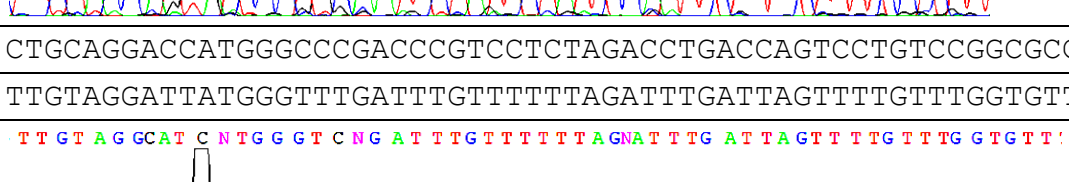
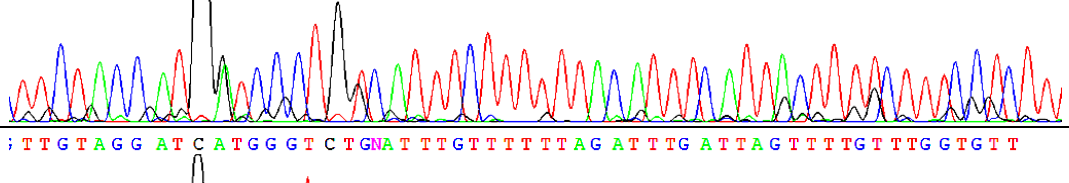
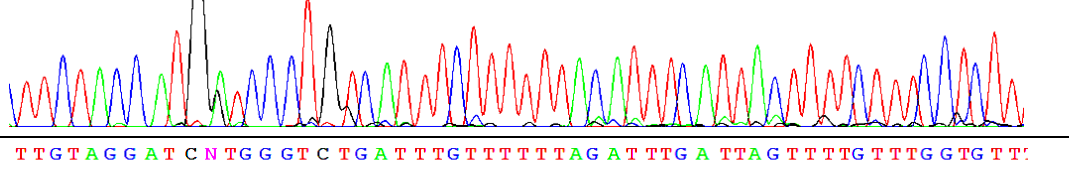
Die Mutanten *M.HgiEI* E215D D290G und *M.HgiEI* E215D V289A D290G konnte ohne weitere Mutationen aus SURE<sup>®</sup> isoliert werden. Die resultierenden Mutationen wurden dann, wie in Abbildung 21 dargestellt, in pEIM-5 Bam bzw. Xba eingefügt. Die hierbei resultierenden Klone wurden entsprechend Tabelle 30 benannt.

**Tabelle 30: Benennung der Plasmide mit den neuen Mutanten**

Quelle der Mutation	Linker	Benennung
<i>M.HgiEI</i> E215D D290G	BamHI	pEIM-5 Bam 215/290M
<i>M.HgiEI</i> E215D V289A D290G		pEIM-5 Bam 215/289/290M
<i>M.HgiEI</i> E215D D290G	XbaI	pEIM-5 Xba 215/290M
<i>M.HgiEI</i> E215D V289A D290G		pEIM-5 Xba 215/289/290M

Die Bisulfit-Reaktion wurde lediglich von den richtigen Klonen, also *M.HgiEI* E215D D290G und *M.HgiEI* E215D V289A D290G jeweils zweimal durchgeführt. Jeweils eines der beiden Ergebnisse ist in Tabelle 31 dargestellt.

Vektor	Sequenzier-Ergebnis mit Primer Methyl-Z
--------	---

Vektor	Sequenzier-Ergebnis mit Primer Methyl-Z
BamHI	CTGCAGGACCATGGGCCGAACCGCACCGTACCGGATCCGCTCCGTTCCGGCGCC
BamHI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTGAATTGTATTGTATTGGATTTGTTTTGTTTTGGTGTT
pEIM-5 Bam (2)	
pEIM-5 Bam 215/290M (1)	
pEIM-5 Bam 215/289/290M (1)	
XbaI	CTGCAGGACCATGGGCCCGACCCGTCCTCTAGACCTGACCAGTCCTGTCCGGCGCC
XbaI Bs	TTGTAGGATTATGGGTTTGATTTGTTTTTTAGATTTGATTAGTTTTGTTTGGTGTT
pEIM-5 Xba (2)	
pEIM-5 Xba 215/290M (1)	
pEIM-5 Xba 215/289/290M (1)	

Wie man in Tabelle 31 erkennen kann, zeigen die Mutanten M.*Hgi* EI E215D D290G und M.*Hgi* EI E215D V289A D290G keinerlei zusätzliche Nebenaktivitäten. Sie sind in der Lage, die Sequenzen GGWCC und GGNCC zu methylieren. Sie zeigen aber wie die anderen, in Abschnitt 4.2.2 dargestellten Mutanten von M.*Hgi* EI eine geringere Methylierungsaktivität als die Wildtyp-Methyltransferase M.*Hgi* EI.

### 4.3 Mutante R.*Hgi*BI S176N

Die Mutante R.*Hgi*BI S176N ist eine Schlüssel-Mutante, die von anderen Autoren nicht erhalten werden konnte. Den ersten Versuch dazu machte BLUM (1995), den zweiten KRIESE (1996, unpubl.). BLUM versuchte zunächst, die Endonuklease R.*Hgi*BI S176N unter der Kontrolle der Methyltransferase M.*Hgi*BI zu klonieren. Grundlage für diese Mutagenese war das Plasmid pBI-His (vgl. Abbildung 24). Nachdem dies nicht gelang, versuchte BLUM die Endonuklease R.*Hgi*BI S176N wie R.*Hgi*EI N223I (Typ N und I an den Positionen 176 bzw. 223, weiter deshalb R.*Hgi*EI NI genannt) zu generieren. Diese konnte dadurch erhalten werden, dass ein umorganisiertes Operon von RM.*Hgi*EI für die Klonierung der Mutante verwendet wurde. Dieser Vektor wurde nach Einfügen der Mutation N223I in R.*Hgi*EI pEI-His NI genannt (vgl. Abbildung 24). Die Endonuklease R.*Hgi*EI wurde zu den Genen von C.*Hgi*EI und M.*Hgi*EI in umgedrehter Orientierung kloniert und somit nur vom eigenen Promotor exprimiert. Während die Konstruktion gelang, gelang die Generierung der Mutante R.*Hgi*BI S176N so aber nicht, obwohl die Zelle durch die stärkere heterologe Methyltransferase M.*Hgi*EI geschützt wurde (vgl. Tabelle 23).

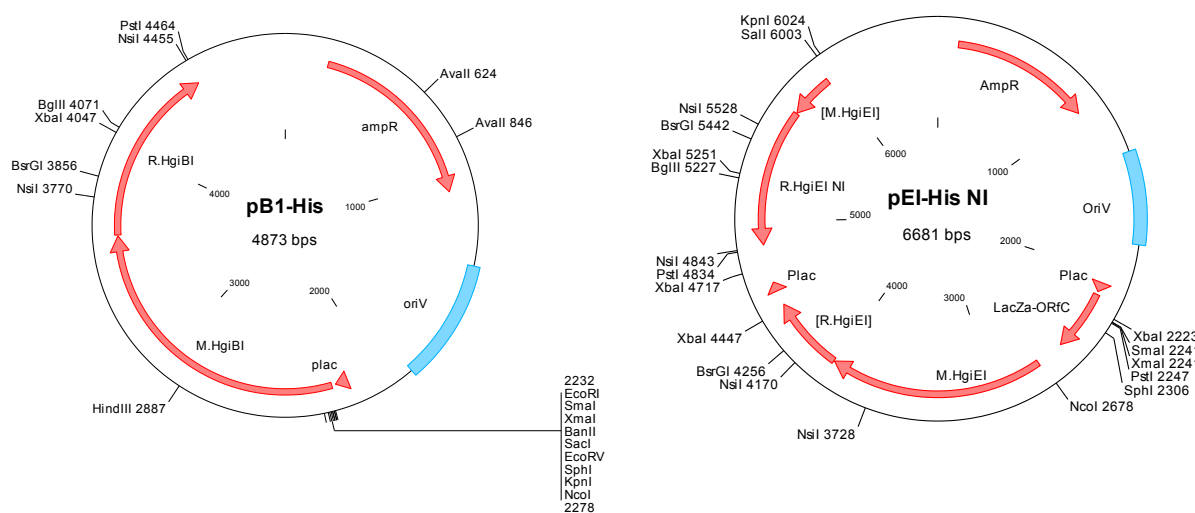


Abbildung 24: Darstellung der Plasmide pBI-His und pEI-His NI.

In dieser Arbeit sollte eine andere Strategie verwendet werden. Im Gegensatz zu der Mutagenese-Strategie von Erwin BLUM, der die Mutante R.*Hgi*BI S176N mittels Einfügen der Mutation S176N über Restriktionsverdau herstellen wollte, sollte in dieser Arbeit zunächst die Mutagenese über inverse PCR direkt erfolgen. Dazu wurden die in Tabelle 6 dargestellten Primer verwendet. Das *template* war pBI-His. Die inverse PCR war erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden ligiert, mit *DpnI* zur Eliminierung des *templates* verdaut und in SURE<sup>®</sup>, HB101, und pHK662/HB101 transformiert. Hierbei konnten lediglich in dem Stamm pHK662/HB101 drei Klone erhalten werden. Alle drei Klone besaßen allerdings eine defekte

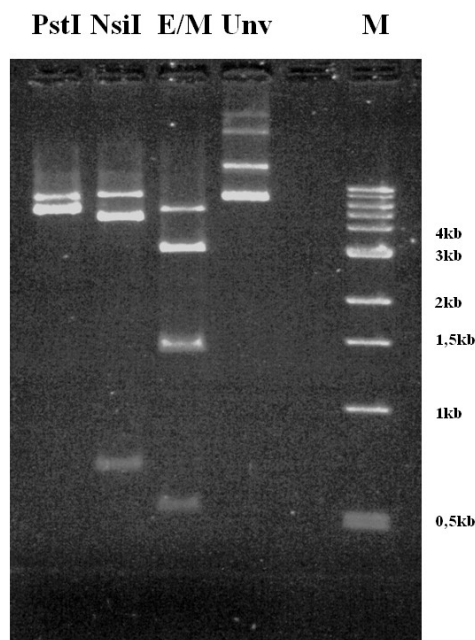




Verwendung der unvollständigen Endonuklease sollte hierbei das Problem der höheren Aktivität der Endonuklease umgangen werden. Das kleine mutierte *NsiI*-Fragment aus pKF3 sollte dann in das mit *PstI* geschnittene Plasmid pBI-His eingefügt werden, um somit den Vektor pKF3mut zu erzeugen.

Die Mutagenese des Plasmids pKF3 stellte sich als zunächst schwierig heraus. Deshalb wurde als Kontrolle für die Mutagenese-PCR der Vektor pBI-His mit denselben Primern invers amplifiziert, da dies bereits erfolgreich gewesen war (siehe oben). Jetzt war die Mutagenese für die beiden Plasmide erfolgreich. Es handelte sich vorher vermutlich um ein technisches Problem bei der PCR. Nach Ligation der linearen PCR-Produkte und nachfolgender Transformation in pHK662/HB101 konnten jeweils einige Klone bei der Mutagenese von pKF3 und von pBI-His erhalten werden. Alle Klone aus pKF3 wurden als Wildtyp-Sequenzen identifiziert. Die Sequenzierung der Klone aus pBI-His zeigte ein überraschendes Ergebnis: Ein Klon enthielt die gesuchte Mutante *R.HgiBI* S176N!

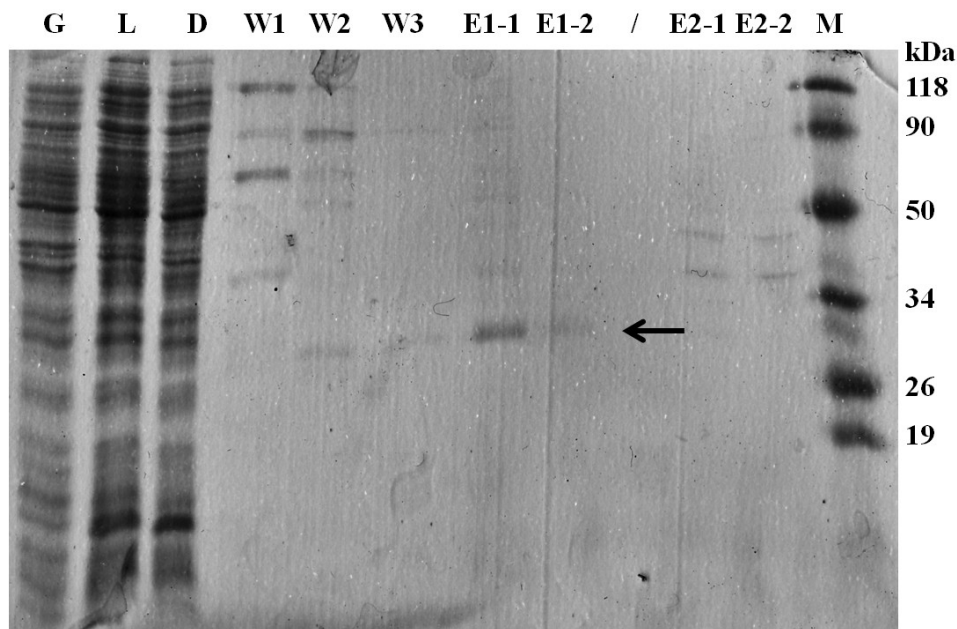
Um zu überprüfen, warum jetzt die Mutagenese von *R.HgiBI* erfolgreich gewesen war, wurde das komplette Operon aus pBI-His sequenziert: Die Methyltransferase *M.HgiBI* besitzt demnach einen Frame-Shift nach der Aminosäureposition 42. Es kommt daher relativ früh zum Abbruch der Synthese der Methyltransferase *M.HgiBI*. Dieses völlig unerwartete Ergebnis gibt Anlass zu der Frage, warum die Endonuklease *R.HgiBI* S176N ohne den Schutz durch die zugehörige Methyltransferase klonieren werden konnte. Diese Frage ließ sich durch einen Restriktionsverdau des Plasmides (weiterhin pKF3mut genannt; vgl. Abbildung 26) relativ schnell klären. Bei Linearisierung des erhaltenen Plasmides mit *PstI* konnten zwei Banden beobachtet werden. Dies ließ nun den Schluss zu, dass in dem neuen Stamm pKF3mut zwei unterschiedliche Plasmide vorliegen. Ein Plasmid zeigte mit 5kb die Größe des mutierten Plasmides pBI-His und ein Plasmid war mit 6kb etwas größer. Ein Verdau mit *NsiI*, der pKF3mut zweimal schneidet (resultierende Fragmente 685bp und 4187bp) wies nicht nur die zwei genannten Banden auf, sondern die bei dem *PstI*-Verdau ebenfalls beobachtete zusätzliche Bande mit 6kb.



**Abbildung 26: Darstellung des Plasmides pKF3mut.** E/M: Verdau mit *EcoRI* und *Mva*1269I, unv= unverdaut, M= 1kb ladder von NEB.

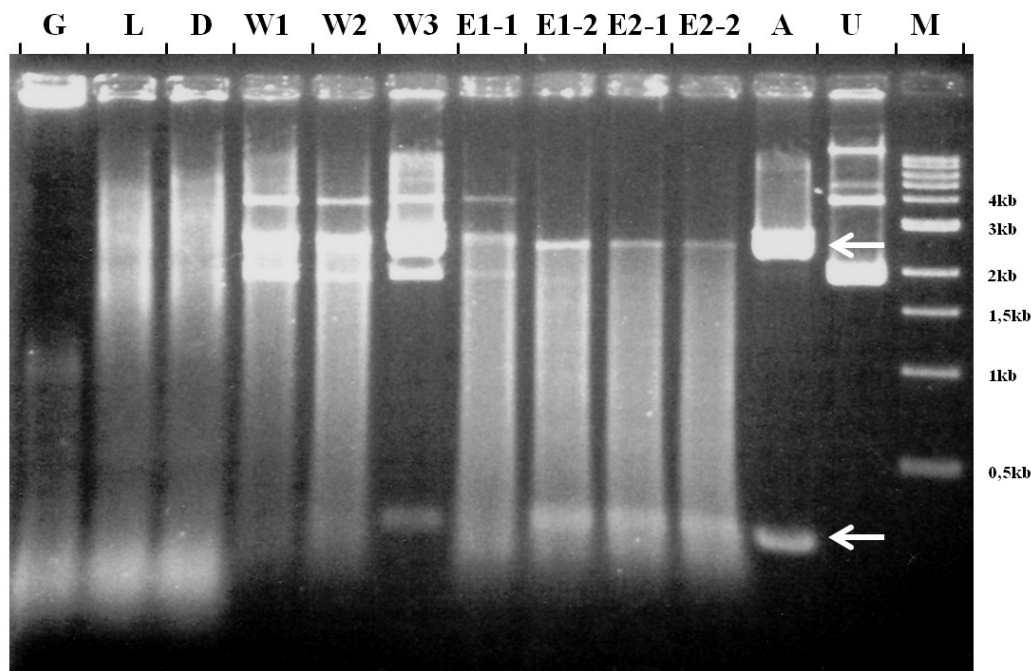
Als zusätzliches Plasmid kam aufgrund der Stamm-Konstruktion nur das Helfer-Plasmid pHK662 in Frage. Durch den Verdau mit *EcoRI*/*Mva*1269I konnte das zweite Plasmid als pHK662 identifiziert werden. Somit ist die unerwartete Beobachtung erklärt: *M.HgiCII*, die auf dem Plasmid pHK662 kodiert ist, ist in der Lage, die Zellen vor der Endonuklease *R.HgiBI* S176N durch Methylierung zu schützen. Eine weitere Methylierung durch *M.HgiBI* wird nicht benötigt. Das Gen für *M.HgiBI* konnte also „folgenlos“ mutieren. Unklar an dieser Stelle ist, ob hier ein unbekannter Selektionsdruck herrscht, z.B. weil die *M.HgiBI* eine unbekannte, aber schädliche Nebenaktivität hat.

Um zu überprüfen, ob die nun erhaltene Mutante tatsächlich eine aktive Endonuklease kodiert, wurde die Endonuklease wie in Abschnitt 3.7.1 dargestellt überexprimiert und wie in Abschnitt 3.7.2 dargestellt aufgereinigt. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in Abbildung 27 dargestellt.



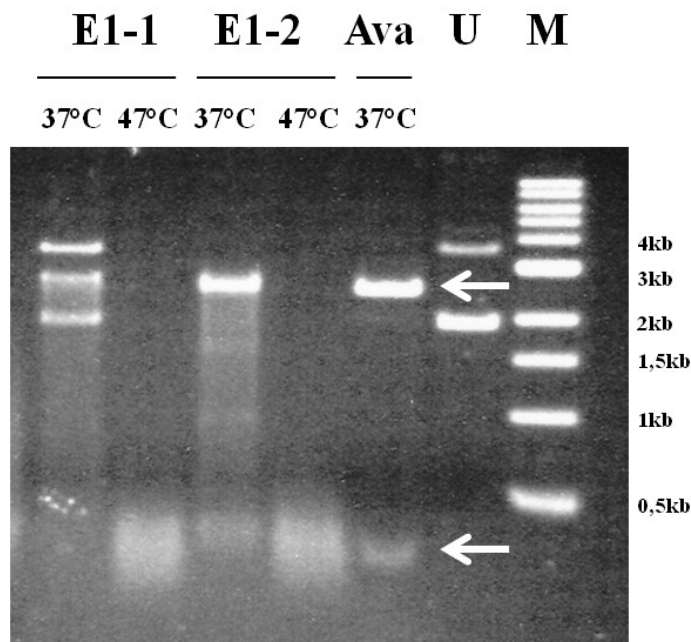
**Abbildung 27: Ergebnis der Aufreinigung der Mutante *R.HgiBI* S176N (SDS-PAGE).** Mit schwarzem Pfeil markiert sind die erwarteten Proteinbanden. Abkürzungen: G= Gesamt, L= Lysat, D= Durchfluss, W1= Wasch 1, W2= Wasch 2, W3= Wasch 3, E1-1= Eluat E1-1, E1-2= Eluat E1-2, E2-1= Eluat E2-1, E2-2= Eluat E2-2. M= Proteinmarker von Fermentas.

Das Protein, welches ein Molekulargewicht von ungefähr 32kDa aufweist, konnte in der Eluatfraktion E1-1 und E1-2 erhalten werden. Das so isolierte Protein wurde für einen Testverdau mit pUC19 eingesetzt (vgl. Abbildung 28). Als Kontrolle zu diesem Verdau wurde pUC19 mit kommerziellem *AvaII* verdaut.



**Abbildung 28: Verdau von pUC19 mit den Fraktionen aus der His-Tag-Aufreinigung von *R.HgiBI* S176N.** Mit weißen Pfeilen markiert sind die Banden, welche bei einem *AvaII*-Verdau von pUC19 entstehen. Abkürzungen: G= Gesamt, L= Lysat, D= Durchfluss, W1= Wasch 1, W2= Wasch 2, W3= Wasch 3, E1-1= Eluat E1-1, E1-2= Eluat E1-2, E2-1= Eluat E2-1, E2-2= Eluat E2-2, A= Verdau von pUC19 mit *AvaII*, U= unverdaute Kontrolle, M= 1kb ladder von NEB.

Wie in Abbildung 28 zu sehen, sind die Enzyme in den verschiedenen Fraktionen (besonders natürlich die Eluate E1-1, E1-2, E2-1 und E2-2) in der Lage, pUC19 zu verdauen. Allerdings ist stets ein starker unspezifischer Abbau zu beobachten. Um auszuschließen, dass ein ungünstiges Enzym/DNA-Verhältnis verwendet worden ist, wurde der Verdau mit derselben Menge DNA, aber weniger Enzym wiederholt (vgl. Abbildung 29). Gleichzeitig wurde überprüft, ob dieses Enzym bei 37°C oder bei 47°C aktiver ist, da KRIESE (unpubl.) ermittelt hatte, dass *R.HgiBI* WT bei 47°C aktiver ist, als bei 37°C.



**Abbildung 29: Darstellung der Verdaue mit Hilfe von *R.HgiBI* S176N.** Verdaut wurde pUC19 mit den Eluates E1-1 und E1-2 bei 37°C bzw. 47°C. pUC19 wurde außerdem mit *AvaII* verdaut (Spur Ava), dies wurde nur bei 37°C durchgeführt. Mit weißen Pfeilen markiert sind die Banden, die beim Verdau von pUC19 mit *AvaII* entstehen. U= unverdaut, M= 1kb ladder von NEB.

Abbildung 29 belegt für *R.HgiBI* S176N bei 37°C eine gute Aktivität, während bei 47°C offenbar sehr schnell unspezifische, sehr kleine Fragmente entstehen.

Entgegen der Erwartung zeigt die Fraktion E1-1 mit regelmäßig der höchsten Enzym-Konzentration nur einen unvollständigen *AvaII*-Verdau. Deshalb wurde diese Expression wiederholt. Erneut zeigte sich ein ähnliches Muster (mehr Enzym = weniger *AvaII*-Aktivität, mehr unspezifischer Verdau).

Nach Erhalt der Mutante *R.HgiBI* S176N als pKF3mut wurde das Projekt von Seite 76 oben wieder neu aufgenommen, um zu testen, ob die Methyltransferase *M.HgiBI* nicht doch für die Klonierung von *R.HgiBI* S176N ausreichen würde. Hierzu wurde aus dem Plasmid pKF3mut über *NsiI* das mutierte Fragment der Endonuklease *R.HgiBI* S176N herausgeschnitten und in mit *PstI* geschnittenes pBI-His eingefügt.

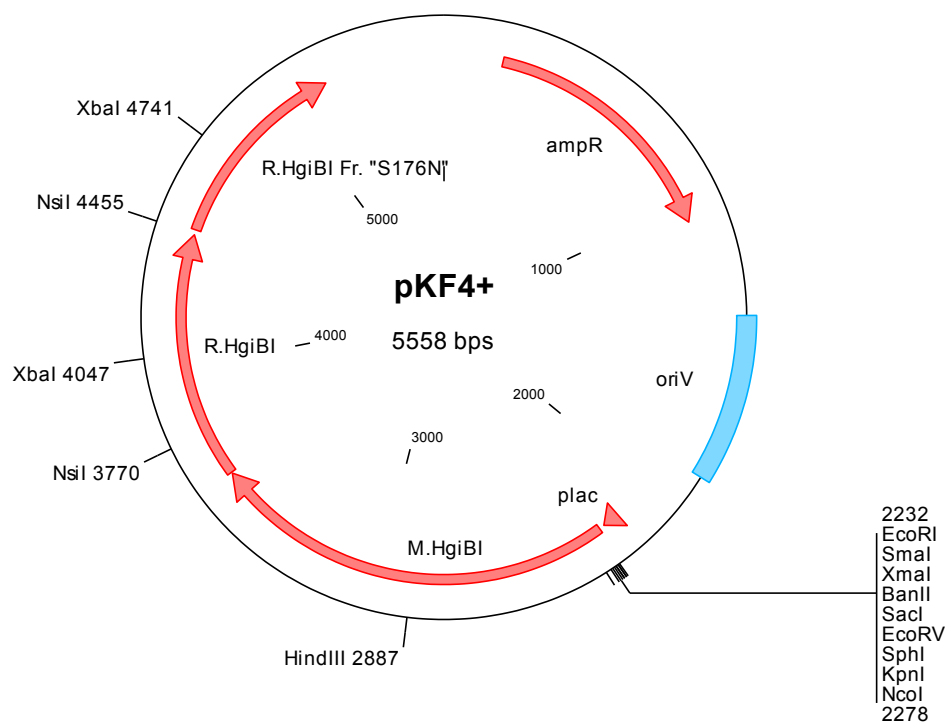
Das aus der Kombination von pBI-His und pKF3mut resultierende Plasmid wurde pKF4 genannt. Auch hier gibt es wie bei dem Vektor pKF3 zwei mögliche Orientierungen, die über einen Verdau

mit *MunI* und *PstI* gut zu charakterisieren sind. In Tabelle 32 sind die Schnittpositionen von *MunI* und *PstI* für die beiden Orientierungen (+) und (-) dargestellt.

**Tabelle 32: Charakteristischen Bandengrößen von pKF4+ und pKF4- bei einem Verdau mit *PstI* und *MunI*.** Die Gesamtgröße der beiden Plasmide beträgt 5197bp. Grau hinterlegt sind die Banden, durch die man die beiden Plasmide eindeutig unterscheiden kann.

pKF4-		pKF4+	
Schnittpositionen	Bandengrößen	Schnittpositionen	Bandengrößen
2115	93bp	2115	93bp
2208	1375bp	2208	1375bp
3583	1031bp	3583	694bp
4614	181bp	4277	518bp
4795	2517bp	4795	2517bp

Das gewünschte Resultat der Ligation ist das Plasmid pKF4+. Es ist deshalb in Abbildung 30 dargestellt. Die entsprechende Plasmidkarte des Plasmides pKF4- befindet sich im Anhang auf Seite 151. Bei pKF4+ befinden sich *in frame* hintereinander die Endonuklease R.*HgiBI* in der nicht mutierten Form gefolgt von dem kleinen, mutierten R.*HgiBI*-Fragment aus pKF3mut, das keine eigene Ribosomenbindestelle besitzt und deshalb in dieser Form nicht exprimiert werden sollte.



**Abbildung 30: Darstellung des Plasmids pKF4+.**

In dieser Orientierung sollten durch eine einfache Deletion über *XbaI* die Wildtyp-Aminosäure-Position 176 herausfallen. Es sollte nur die Mutation S176N übrig bleiben.

Der Vektor pKF4+ konnte durch die oben geschilderte Methode in pHK662/HB101 einem Schritt erhalten werden. Drei von vier charakterisierten Klonen wiesen das richtige Spaltungsmuster mit *MunI*/*PstI* auf. Der vierte Klon konnte als das Ursurpsplasmid pBI-His charakterisiert werden. Der Vektor pKF4+ wurde mit *XbaI* geschnitten, das große Fragment isoliert, ligiert und in SURE<sup>®</sup>, HB101, BL21 und pHK662/HB101-Zellen transformiert. Durch diese Selbstligation sollte das Plasmid pKF5 entstehen (vgl. Abbildung 31). Dieses Konstrukt entspricht in der Art der *M.HgiBI*-Anbindung dem Vektor pBI-His (*LacZ<sub>α</sub>*-Fusion der Methyltransferase). Der einzige Unterschied besteht darin, dass keine *PstI*-Schnittstelle mehr vorhanden ist. Der für die Aufreinigung wichtige His-Tag ist weiterhin vorhanden.

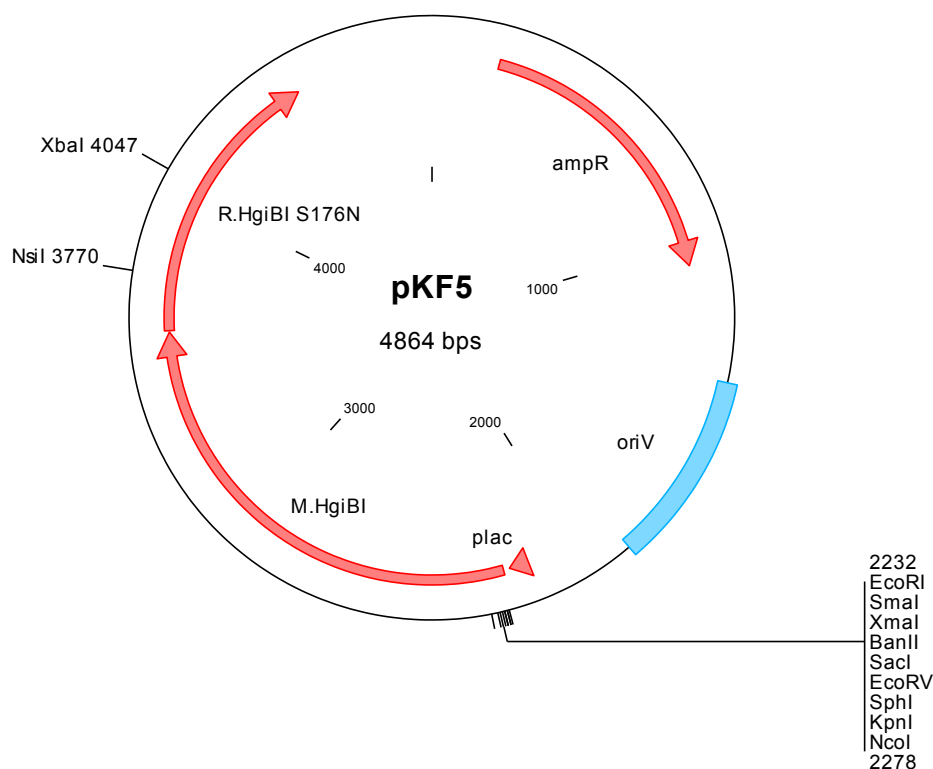


Abbildung 31: Darstellung des Vektors pKF5.

Das Ergebnis der Transformation zeigte, dass sich dieses Konstrukt weder in BL21 noch in HB101-Zellen etablieren ließ. Bei den BL21-Zellen konnten keine Klone erhalten werden, bei den HB101-Zellen konnten nur solche Plasmide isoliert werden, die ein deletiertes RM-System trugen. Einige davon waren *AvaII*-resistent. Sie trugen also noch die Methyltransferase. Bei anderen war nicht einmal mehr die Methyltransferase im Plasmid vorhanden. Diese Plasmide waren folglich nicht mehr *AvaII*-resistent.

Bei SURE<sup>®</sup> und pHK662/HB101-Zellen schien es zunächst, dass die Transformation erfolgreich durchgeführt werden konnte (es konnte kein deutlicher Unterschied in der Größe beobachtet werden). Bei SURE<sup>®</sup> konnte ein Klon, bei pHK662/HB101 drei Klone isoliert werden. Nach

Sequenzierung zeigte sich, dass zwar alle Klone die gesuchte Mutation S176N, aber auch zusätzliche Mutationen trugen. Offensichtlich führen die zusätzlichen Mutationen dazu, dass keine aktive Endonuklease gebildet wird. Bei SURE<sup>®</sup> war nach der Position S176N eine Deletion von 55bp zu beobachten. Dies führte zu einem Frame-Shift und deshalb zu einem internen Stoppcodon. Die Klone aus pHK662/HB101 trugen alle eine Einzel-Basen-Deletion, entweder vor der S176N Mutation (ein Klon) oder nach der Mutation (zwei Klone).

Aus diesen Versuchen ist endgültig deutlich geworden, dass eine Methylierung durch die wildtypische *M.HgiBI* keinen ausreichenden Schutz vor der Mutation *R.HgiBI* S176N darstellt. *M.HgiCII* bietet dagegen einen ausreichenden Schutz. Damit musste eine Serie von Konstrukten entworfen werden, die klären, ob sich die Mutante *R.HgiBI* S176N auch unter dem Schutz von *M.HgiEI* herstellen lässt. Zusätzlich ergibt sich die Frage, ob eine Klonierung der Mutante *R.HgiBI* S176N vielleicht unter dem Einfluss des kleinen Leserahmens *C.HgiBI* möglich ist.

#### **4.4 Expression von *R.HgiBI* S176N in Abhängigkeit homologer und heterologer Methyltransferasen und Kontrollproteine**

Nachdem es prinzipiell gelungen war, die Mutante S176N des *HgiBI*-Restriktionsenzymes herzustellen, eröffnete sich die Möglichkeit, das Phänomen der Nichtklonierbarkeit unter der Kontrolle der homologen Methyltransferase *M.HgiEI* auf den Einfluss weniger Aminosäuren einzugrenzen. In einer Arbeitshypothese wurden wenige Aminosäuren aus der *target recognition domain* der eng verwandten Methyltransferasen *M.HgiBI*, *M.HgiCII* und *M.HgiEI* als molekulare Ursache angenommen. Hier könnten die Unterschiede bei der Methylierung der GGSCC-Sequenz eine entscheidende Rolle spielen (vgl. Abbildung 12). Außerdem soll der Einfluss der kleinen Leserahmens OrfC in diese Untersuchungen sowohl zur homologen als auch zur heterologen Expression mit einbezogen werden.

##### **4.4.1 *M.HgiEI* Varianten**

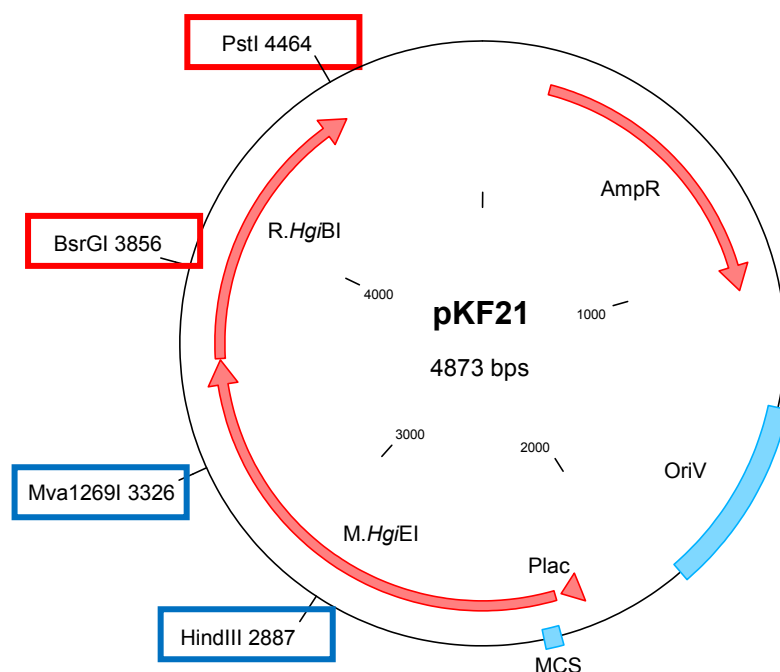
Nachdem erkannt wurde, dass *M.HgiBI* nicht, *M.HgiCII* aber sehr wohl in der Lage ist, die Aktivität von *R.HgiBI* S176N zu kontrollieren, sollte untersucht werden, ob *M.HgiEI* oder Varianten davon ebenfalls in der Lage sind, diese Aktivität zu kontrollieren. Anhand der Ergebnisse von BLUM (1995) wurde spekuliert, dass *M.HgiEI* die Mutante *R.HgiBI* S176N kontrollieren kann. Deshalb wurde die Methyltransferase *M.HgiEI* mit der Endonuklease *R.HgiBI*



kombiniert, und zwar auf Basis von pBI-His (vgl. Abbildung 24). Die Rolle des C-Proteins wurde hierbei zunächst außer Acht gelassen, indem die Methyltransferase *M.HgiEI* ohne OrfC in pBI-His kloniert wurde. Die Methyltransferase *M.HgiEI* ist in dem neu hergestellten Vektor als LacZ $_{\alpha}$ -Fusion vorhanden, ist also genau wie die Methyltransferase *M.HgiBI* in pBI-His angehängt.

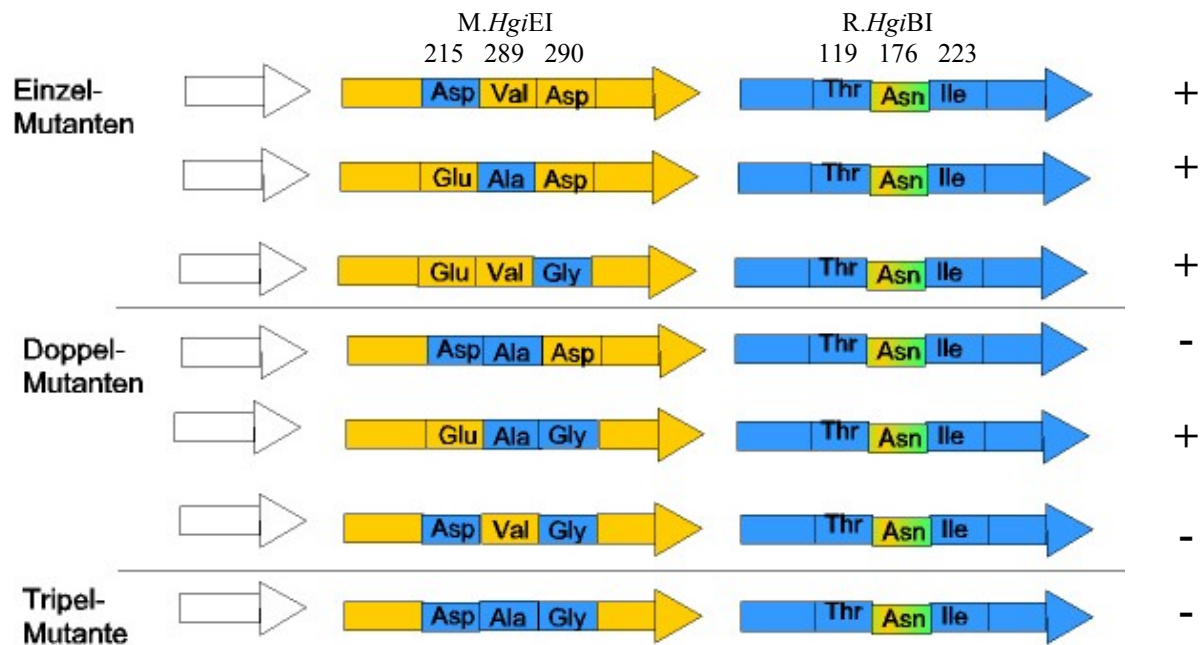
Hierzu wurden pBI-His und pEI-His mit *NcoI/BsrGI* verdaut, und dann das kleine Fragment aus pEI-His (trägt *M.HgiEI* und den Anfang der Endonuklease *R.HgiEI*) und das große Fragment aus pBI-His (trägt den größten Teil der Endonuklease und den Vektoranteil) ligiert.

Die Nutzung des *BsrGI*-Schnitts am Anfang der Endonukleasen ist möglich, weil sich die Sequenzen zwischen *R.HgiEI* und *R.HgiBI* erst distal zu diesem Schnitt unterscheiden. Das resultierende Plasmid wurde pKF21 genannt. Die Plasmidkarte ist in Abbildung 32 gegeben.



**Abbildung 32: Karte des Plasmids pKF21.** Blaue Kästchen umrahmen die für die Veränderung der MTase verwendeten Schnittstellen, rote Kästchen die Schnittstellen, welche für die Kombination mit der Mutation S176N in der Endonuklease verwendet wurden. Das Gen für *M.HgiEI* liegt aus klonierungstechnischen Gründen als LacZ $_{\alpha}$ -Fusionsprotein vor. Nach 25 Aminosäuren aus LacZ $_{\alpha}$  beginnt die MTase mit der ersten Aminosäure.

Um nun auch zu überprüfen, ob Mutanten der Methyltransferase *M.HgiEI* einen Einfluss auf die Klonierbarkeit von *R.HgiBI* S176N haben, sollten zum einen die in der Diplomarbeit hergestellten Mutanten von *M.HgiEI*, zum anderen noch zusätzliche, in dieser Arbeit hergestellte Mutanten, in pKF21 eingefügt werden. Hier wurde soweit wie möglich systematisch vorgegangen, indem die zwischen *M.HgiEI* und *M.HgiBI* unterschiedlichen Aminosäuren jeweils einzeln oder gemeinsam ausgetauscht wurden. Die fertig kombinierten Mutanten sind in Abbildung 33 dargestellt. Bei *M.HgiEI* handelt es sich hierbei um Mutationen an der Aminosäure-Positionen 215 (E→D), 289 (V→A) und 290 (D→G), bei *R.HgiBI* um eine Mutation der Position 176 (S→N). Die Tripelmutante von *M.HgiEI* entspricht weitestgehend dem Wildtyp von *M.HgiBI*.



**Abbildung 33: Systematik der zu erstellenden Methyltransferase-Mutanten, mit welchen versucht werden soll, die Mutante *R.HgiBI* S176N ohne Einfluss des OrfC zu erhalten.** Mit + gekennzeichnet sind die Mutanten, welche bereits in der Diplomarbeit hergestellt worden sind, mit – solche, welche hier noch hergestellt werden müssen (vgl. Abschnitt 4.2.3). Oberhalb der einzelnen Proteine sind die Aminosäurepositionen, welche verändert werden sollen, angegeben.

#### 4.4.1.1 Kombination von *R.HgiBI* S176N mit *M.HgiEI*-Mutanten aus Diplomarbeit

Die Kombination von pKF21 mit den mutierten Methyltransferasen wurde dadurch bewerkstelligt, dass pKF21 und die für die mutierten Methyltransferasen kodierenden Plasmide (vgl. Anhang Seite 146) jeweils mit *HindIII*/*Mva*1269I geschnitten wurden. In den Grenzen dieser Schnitte befinden sich alle in der Diplomarbeit eingeführten Mutationen. Es wurde nun stets das kleine Fragment der mutierten MTase-Plasmid mit dem großen Fragment des Plasmids pKF21 kombiniert. Die mutierten Plasmide wurden wie in

Tabelle 33 angegeben benannt. Sie wurden in pHK662/HB101-Zellen in guter Ausbeute erhalten.

Quelle der <i>M.HgiEI</i> -Mutation	Benennung
<i>M.HgiEI</i> E215D	pKF22
<i>M.HgiEI</i> V289A	pKF23
<i>M.HgiEI</i> D290G	pKF24
<i>M.HgiEI</i> V289A D290G	pKF25

**Tabelle 33: Benennung der aus dem Plasmid pKF21 durch Kombination mit mutierten MTase-Stückchen entstandenen Plasmide.**

Um die Mutation S176N in die Endonuklease *R.HgiBI* einzuführen, wurde das in Abschnitt 4.3 hergestellte Plasmid pKF3mut und die Plasmide pKF21 bis pKF25 mit *Bsr*GI und *Pst*I verdaut und das kleine Fragment aus pKF3mut mit dem großen Fragment aus pKF21 bis pKF25 kombiniert.

Die großen Fragmente aus pKF21 bis pKF25 wurden vor der Ligation dephosphoryliert, um die Effizienz der Ligation zu erhöhen. Die Ligation wurde zunächst in vier verschiedenen Stämme HB101, pHK662/HB101, SURE<sup>®</sup> und BL21 transformiert. Das Ergebnis dieser Transformation ist in den Tabelle 34 und Tabelle 35 aufgeführt. Nicht aufgenommen wurden solche Klone, die bei der Analyse ein falsches *AvaII*-Muster zeigten, um zu gewährleisten, dass von vornherein nur intakte Methyltransferasen untersucht werden. Wie man in Tabelle 34 sehen kann, führte die Transformation der Plasmide pKF21 bis pKF25 häufig zum Einfügen eines gleich großen Fragmentes aus dem *E.coli*-Genom (genannt *E.coli*- Sequenz). Hierbei handelt es sich um einen Klonierungsartefakt, da mit dem kleinen *BsrGI/PstI*-Fragment aus pKF3mut auch Spuren von *E.coli*-DNA aus dem präparativen Gel isoliert werden. Auffallend häufig kommt es zur Bildung einer 24bp Deletion (vgl. Abbildung 34).

**Tabelle 34: Ergebnis der Kombination von pKF21 bis pKF25 mit R.HgiEI S176N in SURE<sup>®</sup>, HB101 und BL21.** Abkürzungen: X= Keine Klone erhalten, \* = Klone erhalten, aber nicht sequenziert. In Klammern sind die Laborbezeichnungen der Klone angegeben.

Plasmid	Quelle der M.HgiEI-Mutation	Mutationstypen im Bakterienstamm		
		SURE	HB101	BL21
pKF21	LacZ <sub>α</sub> -WT	X	1. 24bp Deletion (21-9)	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (21-3) 2. 24bp Deletion (21-2)
pKF22	LacZ <sub>α</sub> -M.HgiEI E215D	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (22-1) 2. 24bp Deletion (22-2)	X	1. 24bp Deletion (22-3)
pKF23	LacZ <sub>α</sub> -M.HgiEI V289A	X	1. 24bp Deletion (23-2)	1. 24bp Deletion (23-4)
pKF24	LacZ <sub>α</sub> -M.HgiEI D290G	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (24-7)	*	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (24-3)
pKF25	LacZ <sub>α</sub> -M.HgiEI V289A D290G	X	*	*

		103	107	111	115	119
		<u>AlaAlaLeuAspGlnAlaGlnTrpAlaAlaIleAspGlnLeuIleSer</u>				
WT seq	GAAATTATGATATTCAA	<u>GCAGCACTTGATCAAGCACAAATGGGCAGCAATTGATCAATTAATTTCT</u>				
Mutante	GAAATTATGATATTCAA	-----GCAGCAATTGATCAATTAATTTCT				

**Abbildung 34: Darstellung der 24bp Deletionsmutante aus der Transformation von pKF21-pKF25 und pKF42 kombiniert mit der Mutation S176N.** Unterstrichen sind fast identische Wiederholungen der Sequenzen.

Bei dieser mehrfach erhaltenen Variante sind 24bp relativ nahe der Aminosäure-Position 119 deletiert. Dies führt nicht zu einem frühzeitigen Abbruch des Leserahmens, sondern zu der

Deletion von acht Aminosäuren aus der sonst erhaltenen *R.HgiBI*. Diese als „24bp-Deletion“ bezeichnete Mutante wird im Abschnitt 4.4.2 weiter behandelt.

Da BLUM (1995) die Endonuklease *R.HgiCII* nur aus vormethylierten Zellen erhalten konnte, wurde die entsprechende Transformation von nun an nur noch in mit pHK662 vormethylierten HB101-Zellen durchgeführt (genannt pHK662/HB101). Die bis *dato* erhaltenen Klone aus HB101, BL21 und SURE® wurden verworfen.

Wie in Tabelle 35 gelistet führte auch die Transformation der Plasmide pKF21 bis pKF25 in pHK662/HB101 zu unspezifischen Änderungen. Zwar konnte die Endonuklease *R.HgiBI* S176N in mehreren Fällen erhalten werden, aber es wurden etliche zusätzliche Mutationen entweder an Position 97 (pKF23, pKF25) oder 189 (pKF22) beobachtet. Auffällig ist, dass alle drei dieser Mutationen eine Mutation von Arginin nach Glutamin auslösten.

**Tabelle 35: Ergebnis der Kombination der Plasmide pKF21 bis pKF25 mit *R.HgiBI* S176N in pHK662/HB101.** In Klammern sind die Laborbezeichnungen der Klone angegeben. Zusätzliche Mutation an Position X bedeutet, dass neben der „richtigen“ Mutation S176N eine weitere eingefügt wurde.

Plasmid	Quelle der <i>M.HgiEI</i> -Mutation	Mutationstyp in pHK662/HB101
pKF21	LacZ <sub>α</sub> -WT	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (21-7, 21-12, 21-13, 21-14) 2. 24bp-Deletion (21-6, 21-8)
pKF22	LacZ <sub>α</sub> - <i>M.HgiEI</i> E215D	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (22-7, 22-9) 2. 24bp-Deletion (22-4, 22-5) 3. bisher unerklärlich (22-6) 4. Zusätzliche Mutation (Position 189, R→Q, 22-8)
pKF23	LacZ <sub>α</sub> - <i>M.HgiEI</i> V289A	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (23-9, 23-11) 2. 24bp-Deletion (23-5, 23-8) 3. Wildtyp (23-7) 4. Zusätzliche Mutation (Position 97, R→Q, 23-12)
pKF24	LacZ <sub>α</sub> - <i>M.HgiEI</i> D290G	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (24-12) 2. 24bp-Deletion (24-4, 24-5, 24-6)
pKF25	LacZ <sub>α</sub> - <i>M.HgiEI</i> V289A D290G	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (25-1) <sup>°</sup> 2. 24bp-Deletion (25-4, 25-5) 3. Zusätzliche Mutation (Position 97, R→Q, 25-3)

<sup>°</sup> bei der Transformation wurden diese Klone auf LB-Platten mit 150µg/ml Amp ausgestrichen

Diese Ergebnisse könnten auf drei unterschiedliche Arten erklärt werden:

- Die verwendete Methyltransferase *M.HgiEI* ist als *LacZ<sub>α</sub>*-Fusionsprotein nicht in der Lage, ihre Funktion vollständig auszufüllen.
- Durch die Nutzung des *P<sub>lac</sub>*-Promotors kommt es zu einer zu starken Expression sowohl von der Methyltransferase als auch von der Endonuklease.
- Die Vormethylierung durch pHK662 reicht nicht aus, um die Zellen vor der entstehenden Endonuklease zu schützen.

Die erste Hypothese sollte durch ein neues Plasmid abgeklärt werden. Hierbei wurde aus dem neu erstellten Plasmid pEIM-5 durch Fragmentierung mit *EcoRI* und *Mva1269I* das kleine Fragment isoliert und mit dem großen Fragment aus dem *EcoRI/Mva1269I* geschnittenen Plasmid pKF21 kombiniert. Das Ergebnis der darauffolgenden Ligation ist eine Kombination aus wildtypischer *M.HgiEI* in einer Direkt-Stopp-Anbindung (d.h. erst 5 Codons vor dem ATG der Methyltransferase bricht die Sequenz von *LacZ<sub>α</sub>* ab) mit der wildtypischen Endonuklease *R.HgiBI* oder auch kurz pKF29 genannt. Die Karte dieses Plasmids ist auf Seite 143 dargestellt. pKF29 konnte in pHK662/HB101-Zellen erfolgreich hergestellt werden.

In das Plasmid pKF29 wurden, wie bei der Herstellung der Plasmide pKF22 bis pKF25 auch, über einen *HindIII/Mva1269I*-Verdau die kleinen Fragmente aus den mutierten Methyltransferase-Genen eingefügt. So wurden die in Tabelle 36 aufgelisteten Plasmide erstellt.

**Tabelle 36: Benennung der aus dem Plasmid pKF29 durch Kombination mit mutierten MTase-Stückchen entstandenen Plasmide.**

Quelle der <i>M.HgiEI</i> -Mutation	Benennung
<i>M.HgiEI</i> E215D	pKF32
<i>M.HgiEI</i> V289A	pKF33
<i>M.HgiEI</i> D290G	pKF34
<i>M.HgiEI</i> V289A D290G	pKF35

Die vier Plasmide ließen sich in pHK662/HB101 problemlos herstellen. Sie wurden analog zum Vorgehen bei den Plasmiden pKF21 bis pKF25 mit der Mutation S176N kombiniert, und in die vier Stämme SURE<sup>®</sup>, BL21, HB101 und pHK662/HB101 transformiert.

Wie in Tabelle 37 gezeigt, bringt das Verwenden des Plasmids pKF29 keinen Vorteil für die Klonierbarkeit von *R.HgiBI* S176N in SURE<sup>®</sup>, HB101 und BL21. Die Transformationsausbeute war geringer. In den untersuchten Klonen kam es zu keinem positiven Ergebnis, d.h. es wurde kein Endonuklease-Gen eingebaut.

**Tabelle 37: Ergebnis der Kombination der Plasmide pKF29, pKF32 bis pKF35 mit R.HgiBI S176N in SURE<sup>®</sup>, HB101 und BL21.** Abkürzungen: X= Keine Klone erhalten, \* = Klone erhalten, aber nicht sequenziert. In Klammern sind die Laborbezeichnungen der Klone angegeben.

Plasmid	Quelle der M.HgiEI-Mutation	Mutationstyp in dem Bakterienstamm		
		SURE <sup>®</sup>	HB101	BL21
pKF29	Direkt-Stop-WT	X	X	X
pKF32	Direkt-Stop-M.HgiEI E215D	*	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (32-3)	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (32-2)
pKF33	Direkt-Stop M.HgiEI V289A	X	*	*
pKF34	Direkt-Stop-M.HgiEI D290G	X	X	X
pKF35	Direkt-Stop-M.HgiEI V289A D290G	X	X	X

Bei der Transformation der Plasmide pKF29, pKF32 bis pKF35 in pHK662 ist wie bei der Transformation der Plasmide pKF21 bis pKF25 keine aktive Endonuklease (siehe Tabelle 38) zu beobachten gewesen.

**Tabelle 38: Ergebnis der Kombination von pKF29, pKF32 bis pKF35 mit R.HgiBI S176N in pHK662/HB101.** In Klammern sind die Laborbezeichnungen der Klone zu finden. Zusätzliche Mutation an Position X bedeutet, dass neben der „richtigen“ Mutation S176N eine weitere eingefügt wurde.

Plasmid	Quelle der M.HgiEI-Mutation	Mutationstyp in pHK662/HB101
pKF29	Direkt-Stop-WT	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (29-9) 2. Deletion von 351bp in der Mitte der Endonuklease (29-10)
pKF32	Direkt-Stop-M.HgiEI E215D	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (32-6, 32-10°, 32-15) 2. Zusätzliche Mutation (Position 182, E→ K, 32-13)
pKF33	Direkt-Stop M.HgiEI V289A	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (33-5, 33-10, 33-11) 2. Richtiger Klon (33-8) 3. Stoppcodon (Position 159, Q→ Stopp, 33-9°)
pKF34	Direkt-Stop-M.HgiEI D290G	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (34-1, 34-6°)
pKF35	Direkt-Stop-M.HgiEI V289A D290G	Keine Klone erhalten!

° bei der Transformation wurden diese Klone auf LB-Platten mit 150µg/ml Amp ausgestrichen

Erneut wurde entweder eine unspezifische *E.coli*-Sequenz gefunden, oder es gab neben der Mutation S176N eine weitere Mutation in der Sequenz (Position 182, pKF32). Einmal führte eine

Punktmutation zu einem internen Stoppcodon in der Endonuklease (pKF33). Außerordentlich bemerkenswert ist dagegen, dass der Klon 33-8 als einziger Klon die richtige Mutation S176N besitzt. Aus diesem Klon konnte aber nur sehr wenig Plasmid-DNA isoliert werden, so dass nur ein Teil der Endonuklease inklusive der Position 176 sequenziert werden konnte. Der Klon konnte weder überimpft, noch durch Ringtransformation neu erhalten werden. Das bedeutet, dass dieser Klon zwar prinzipiell zu erhalten ist, aber augenblicklich nicht weiter genutzt werden kann. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine weitere Mutation im nicht-sequenzierten Bereich zu finden gewesen wäre. Damit erwiesen sich dritte der drei oben genannten Hypothesen als richtig: Die Vormethylierung von pHK662 ist nicht ausreichend für die Kombination der Plasmide pKF21 bis pKF25, pKF29, pKF32 bis pKF35 mit der Mutation *R.HgiBI* S176N.

#### 4.4.1.2 Kombination von *R.HgiBI* S176N mit neuen *M.HgiEI*-Mutanten

Entsprechend dem Schema in Abbildung 33 sollten auch zwei weitere Doppel- und eine Tripel-Mutante von *M.HgiEI* mit *R.HgiBI* S176N kombiniert werden. Es handelt sich um *M.HgiEI* E215D V289A, *M.HgiEI* E215D D290G und *M.HgiEI* E215D V289A D290G. Die Herstellung der dazu benötigten Plasmide wurde in Abschnitt 4.2.3 bereits beschrieben.

Die Doppel- und Tripel-Mutanten wurden wie bei der Herstellung von pKF22 bis pKF25 bzw. pKF32 bis pKF35 (vgl. 4.4.1.1) in die Plasmide pKF21 und pKF29 eingefügt. Die resultierenden Plasmide sollten nach Tabelle 39 benannt werden. Die Herstellung der Plasmide pKF37 bis pKF40 gelang nicht, während die Plasmide pKF41 und pKF42 auf Anhieb erhalten werden konnten. Das Problem der Klonierung von pKF37 und pKF40 kann dadurch erklärt werden, dass die hier eingesetzte Mutante *M.HgiEI* E215D V289A eine weitere, ungewollte Mutation an Position 316 trägt. Es muss angenommen werden, dass das empfindliche Gleichgewicht bei der Transformation durch diese weitere Mutation gestört wird. Ein Grund dafür, dass auch pKF38 und pKF39 im Gegensatz zu pKF41 bzw. pKF42 nicht hergestellt werden konnten, liegt vermutlich auch an der Expressionsrate der Methyltransferase. Hier könnte auch eine unterschiedliche Faltung des Proteins ursächlich sein. Dem konnte aber an dieser Stelle nicht nachgegangen werden.

**Tabelle 39: Benennung der Plasmide mit Doppel- und Tripelmutation**

Ausgangsvektor	Quelle der <i>M.HgiEI</i> -Mutation	Benennung der resultierenden Plasmids
pKF21	<i>M.HgiEI</i> E215D V289A	pKF37
	<i>M.HgiEI</i> E215D D290G	pKF38
	<i>M.HgiEI</i> E215D V289A D290G	pKF39
pKF29	<i>M.HgiEI</i> E215D V289A	pKF40
	<i>M.HgiEI</i> E215D D290G	pKF41
	<i>M.HgiEI</i> E215D V289A D290G	pKF42

Die Plasmide pK41 und pKF42 wurden, wie in 4.4.1.1 dargestellt, mit der Mutation S176N kombiniert und lediglich in pHK662/HB101 transformiert. Das Ergebnis dieser Transformation ist in Tabelle 40 dargestellt. Auch pKF41 und pKF42 kombiniert mit *R.HgiBI* S176N können nicht in mit pHK662 vormethylierten Zellen transformiert werden.

**Tabelle 40: Ergebnis der Kombination von pKF41 oder pKF42 mit *R.HgiBI* S176N in pHK662/HB101.** In Klammern sind die Laborbezeichnungen der Klone zu finden. Zusätzliche Mutation an Position X bedeutet, dass neben der „richtigen“ Mutation S176N eine weitere eingefügt wurde.

Plasmid	Quelle der <i>M.HgiEI</i> -Mutation	Mutationstyp in pHK662/HB101
pKF41	Direkt-Stopp <i>M.HgiEI</i> E215D D290G	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (41-3, 41-7, 41-8) 2. Zusätzliche Mutation (Position 169, E→K, 41-2)
pKF42	Direkt-Stopp <i>M.HgiEI</i> E215D V289A D290G	1. <i>E.coli</i> -Sequenz (42-1, 42-2, 42-3, 42-4, 42-5)

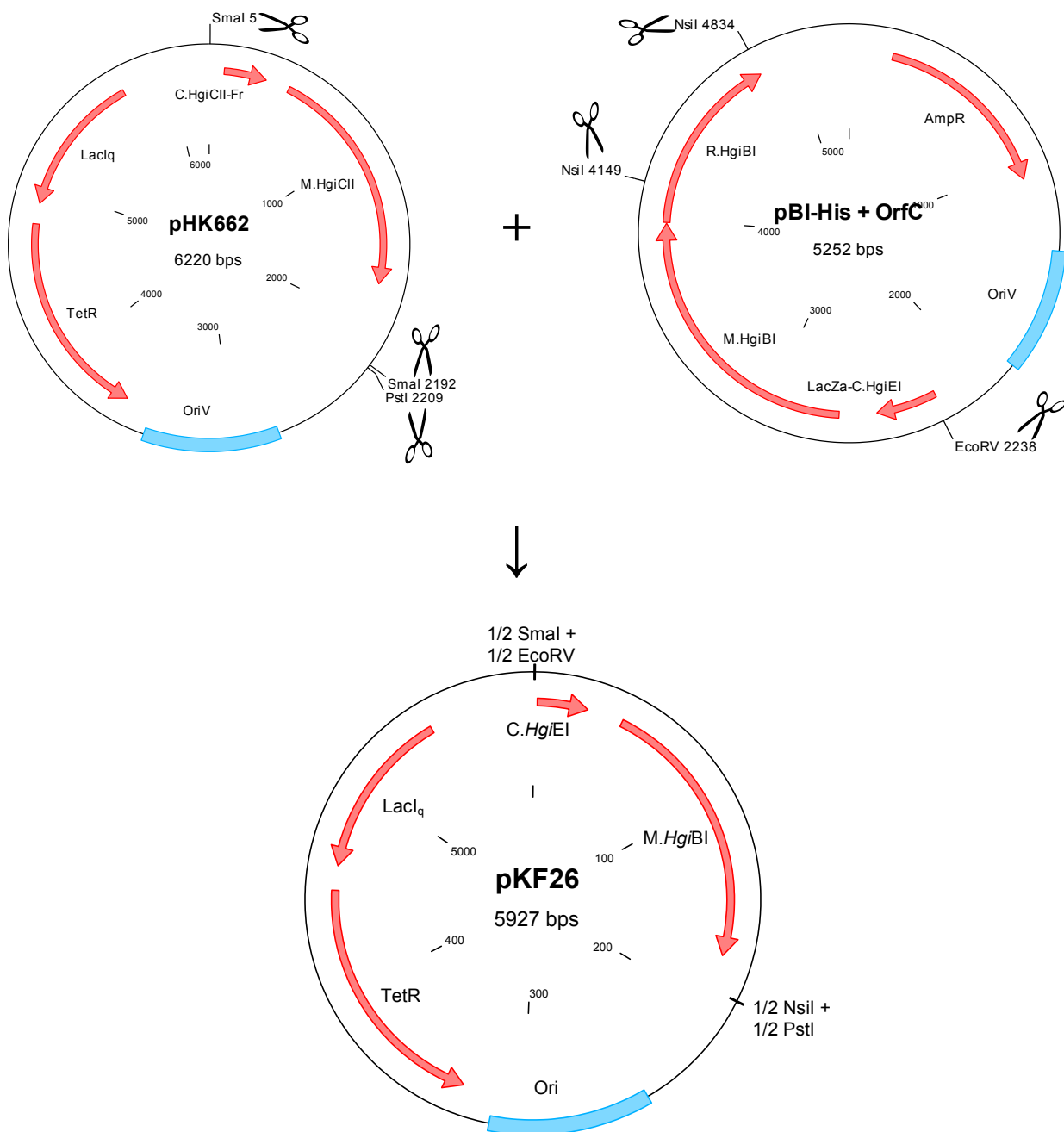
Insgesamt muss festgehalten werden, dass es weder mit den mutierten Methyltransferasen auf der Basis von *M.HgiEI*, noch mit der wildtypischen *M.HgiEI* gelungen ist, in mit pHK662 vormethylierten Zellen die offenbar besonders aggressive Mutante *R.HgiBI* S176N ohne *OrfC* zu klonieren. Ob die Positionen 215, 289 und 290 trotzdem eine Rolle bei der Erhöhung oder Reduzierung der Methylierungseffizienz spielen, wird erst in Abschnitt 4.4.1.3 endgültig geklärt. Der Hypothese Nummer eins von Seite 88, dass die *LacZ<sub>α</sub>*-Fusion von *M.HgiEI* weniger aktiv als das Direkt-Stopp-Konstrukt ist, wird in Abschnitt 4.4.3 weiter nachgegangen.



#### 4.4.1.3 Transformation in mit *M.HgiBI* vormethylierte Zellen

Weil die Transformation der in den vorherigen Abschnitten 4.4.1.1 und 4.4.1.2 beschriebenen Konstrukte auch in pHK662/HB101-vormethylierten Zellen nicht erfolgreich war, wurde überlegt, ob dies evtl. daran liegen könnte, dass *M.HgiBI* eine zusätzliche, in den bisherigen Nebenaktivitätsassays nicht zu findende, Nebenaktivität besitzt (vgl. Abschnitt 4.2), die dann über eine Vormethylierung durch *M.HgiCII* nicht abgedeckt werden könnte. Aus dieser Überlegung heraus wurde ein neues Vormethylierungs-Plasmid hergestellt, der nun nicht mehr *M.HgiCII*, sondern *M.HgiBI* als Methyltransferase trägt. Die Herstellung dieses Plasmids wurde auf Basis von pHK662 vorgenommen. Da hier kein zusätzlicher Promotor (z.B. kein  $P_{Lac}$ ) auf dem Plasmid vorliegt, sollten Störeffekte minimiert sein.

Der Vektor pHK662 wurde mit *SmaI* und *PstI* geschnitten, um die Gene für die Methyltransferase *M.HgiCII* und einen Teil des C-Proteins *C.HgiCII* herauszuschneiden (vgl. Abbildung 35). Gleichzeitig wurde das Plasmid pBI-His + OrfC (Beschreibung der Herstellung siehe Abschnitt 4.4.3) mit *EcoRV* und *NsiI* geschnitten. Das Vektor-Fragment aus pHK662 wurde mit dem die Methyltransferase enthaltenden, 1913bp großen Fragment aus pBI-His + OrfC (von *EcoRV* zur ersten *NsiI*-Schnittstelle) ligiert und in HB101-Zellen transformiert. Das so hergestellte Plasmid wurde pKF26 genannt und ist in Abbildung 35 dargestellt. Es enthält die Methyltransferase *M.HgiBI* und *C.HgiEI*, welches genauso viele Aminosäuren enthält wie *C.HgiCII* in pHK662 (81AA). Die pKF26/HB101-Zellen wurden wie pHK662/HB101-Zellen immer mit 1mM IPTG und Tetrazyklin angezogen. Bei der Herstellung von kompetenten Zellen aus pKF26/HB101 wurde wie bei der Herstellung der kompetenten Zellen aus pHK662/HB101 vorgegangen (vgl. Abschnitt 3.3).



**Abbildung 35: Herstellung des Vektors pKF26.** Die Schnittstellen *EcoRV*, *SmaI*, *PstI* und *NsiI* sind in pKF26 nicht mehr zu finden, da sie entweder mit anderen blunt-geschnittenen Schnittstellen kombiniert wurden (*SmaI*, *EcoRV*), oder weil sie zwar miteinander kombinierbar waren, aber die Schnittstelle durch Ligation nicht mehr schneidbar ist (*PstI*, *NsiI*).

Die Plasmide pKF21 bis pKF25, pKF29, pKF32 bis pKF35, pKF41 und pKF42 aus den Abschnitten 4.4.1.1 und 4.4.1.2 wurden mit der Mutation S176N kombiniert (vgl. Abschnitt 4.4.1.1) und in pKF26/HB101-Zellen transformiert. Das Ergebnis dieser Transformationen ist in Tabelle 41 zusammengefasst.

**Tabelle 41: Ergebnis der Kombination von pKF21 bis pKF25, pKF29, pKF32 bis pKF35 mit R.*Hgi*BI S176N in pKF26/HB101.** In Klammern sind die Laborbezeichnungen der Klone zu finden. Zusätzliche Mutation an Position X bedeutet, dass neben der „richtigen“ Mutation S176N eine weitere eingefügt wurde.

Plasmid	Quelle der M. <i>Hgi</i> EI-Mutation	Mutationstyp in pKF26/HB101
pKF21	LacZ <sub>α</sub> -WT	1. Mutation an Position 169 (E→D ; B21-3)
pKF22	LacZ <sub>α</sub> -M. <i>Hgi</i> EI E215D	1. Mutation an Position 79 (R→Q, B22-2°) 2. Mutation an Position 175 (P→Y; B22-3) 3. Wildtyp (B22-4)
pKF23	LacZ <sub>α</sub> -M. <i>Hgi</i> EI V289A	1. E.coli-Sequenz (B23-1°, B23-2)
pKF24	LacZ <sub>α</sub> -M. <i>Hgi</i> EI D290G	1. E.coli-Sequenz (B24-1°, B24-3) 2. Stoppcodon (W→Stopp, Pos. 110, B24-4)
pKF25	LacZ <sub>α</sub> -M. <i>Hgi</i> EI V289A D290G	1. E.coli-Sequenz (B25-3, B25-7) 2. Mutation an Position 189 (R→Q, B25-1) 3. bisher unerklärlich (B25-5)
pKF29	Direkt-Stop-WT	Keine Klone erhalten
pKF32	Direkt-Stop-M. <i>Hgi</i> EI E215D	1. E.coli-Sequenz (B32-1°, B32-3°)
pKF33	Direkt-Stop M. <i>Hgi</i> EI V289A	1. Stoppcodon (B33-1, Position 78, B33-3°, Position 101) 2. Deletion 4bp (B33-2) 3. E.coli-Sequenz (B33-4°, B33-7, B33-9) 4. Zusätzliche Mutation (Position 153, R→C, B33-6)
pKF34	Direkt-Stop-M. <i>Hgi</i> EI 290G	1. Zusätzliche Mutation (an Position 70, R→H, 34-4)
pKF35	Direkt-Stop-M. <i>Hgi</i> EI V289A D290G	Keine Klone erhalten
pKF41	Direkt-Stopp M. <i>Hgi</i> EI E215D D290G	1. E.coli-Sequenz (B41-1, B41-2, B41-3, B41-5)
pKF42	Direkt-Stopp M. <i>Hgi</i> EI E215D V289A D290G	1. E.coli-Sequenz (B42-2, B42-3, B42-4, B42-5) 2. Richtige Mutation (B42-1) 3. Deletion 6bp (B42-6) 4. Deletion 24bp (B42-7)

° bei der Transformation wurden diese Klone auf LB-Platten mit 150µg/ml Amp ausgestrichen.

Wie man der Tabelle 41 entnehmen kann, ist das Ergebnis der Transformationen der Kombinationen mit S176N nahezu identisch zwischen den Stämmen pKF26 bzw. pHK662.

Während jedoch unter Verwendung von pHK662 gar keine korrekten Rekombinanten beobachtet werden konnten, ergab die Transformation von pKF42 in pKF26 einen richtigen Klon (B42-1). Diese Tripelmutante von *M.HgiEI* an den Position 215, 289 und 290 bildet die gesuchte Ausnahme, nachdem alle anderen Konstrukte zu falschen Produkten führten (vgl. Tabelle 41). Hier war eine Kombination mit der Endonuklease-Mutante *R.HgiBI* S176N möglich. Auch bei pKF33 war ja ein richtiger Klon erhalten worden (vgl. Seite 89), der sich aber nicht weiter kultivieren ließ. Das ist hier anders. Der Klon B42-1 (weiter als pKF42M bezeichnet) konnte stabil angezogen werden. Dieser Klon verliert das Plasmid pKF26, weil es offenbar nicht mehr benötigt wird (Daten nicht gezeigt).

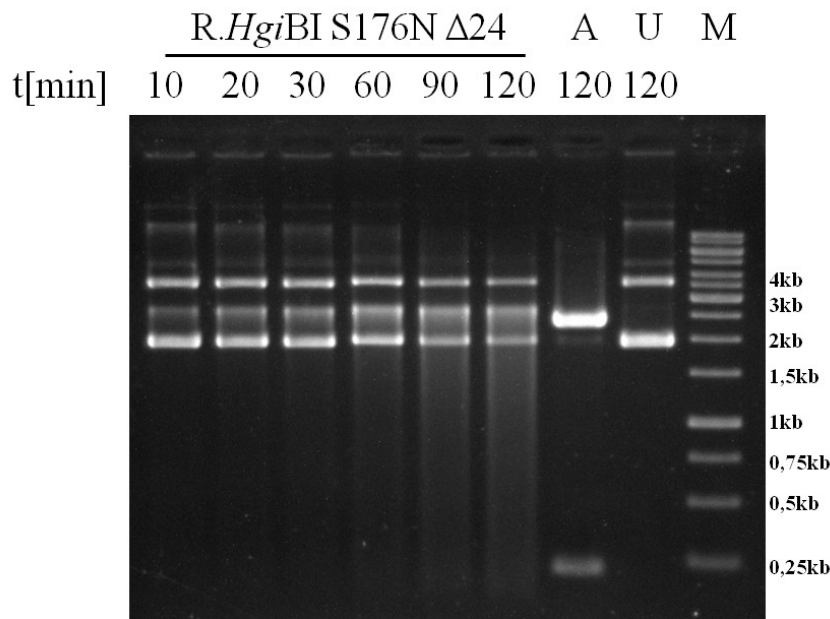
#### 4.4.2 Charakterisierung der 24bp-Deletions-Mutante

Wie in Abschnitt 4.4.1 dargestellt, wurde bei dem Versuch, die Mutante *R.HgiBI* S176N darzustellen, offenbar durch Rekombination eine Deletions-Mutante hergestellt. Insgesamt sind hier acht Aminosäuren in den Positionen 103 bis 110 deletiert. Diese acht Aminosäuren bilden mit den Aminosäuren 111 bis 118 Teil einer Wiederholung über fünf Aminosäuren, die unten dargestellt ist. Die deletierten Aminosäuren sind unterstrichen. Die fünf sich wiederholenden Aminosäuren sind in Fettdruck hervorgehoben. Leucin (kursiv) wird hierbei Isoleucin gleichgestellt. Das besonders wichtige Threonin in Position 119 ist grau hinterlegt. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz von *R.HgiBI* von Position 90 bis 120.

90-----100-----110-----120  
 DHHAVALRNYDIQ**AALDQAQWAAIDQL**STI

Da sich diese Fünfaminosäure-Wiederholung sehr nahe der Position 119 befindet, muss man davon ausgehen, dass sie Teil der *target recognition domain* sind. Diese Wiederholung war früher nicht aufgefallen, lässt sich aber besonders gut auf der Nukleotid-Ebene erkennen (vgl. Abbildung 34). Für die weitere Charakterisierung der Deletionsmutante wurde der im Abschnitt 4.4.1.1 hergestellte Klon 23-4 verwendet. Es handelt sich hierbei um die Kombination von pKF23 (LacZ<sub>α</sub>-Fusion *M.HgiEI* V289A) mit *R.HgiBI* S176N in *E.coli* BL21. Dieser Klon wurde in pKF28 umbenannt. Die Deletionsmutante wurde dann, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben, aufgereinigt und auf ihre Aktivität hin untersucht. Die Aufreinigung gelang beim ersten Anlauf (Daten nicht gezeigt). Das resultierende, verkürzte Enzym wurde *R.HgiBI* S176N Δ24 genannt und mit pUC19 und pKF10 unter verschiedenen Bedingungen (Hochsalz, Niedrigsalz, 37°C, 47°C) inkubiert. Das beispielhafte Ergebnis mit pUC19 bei 37°C und Niedrigsalz-Bedingungen [Puffer 1 von NEB] ist

in Abbildung 36 dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Variante die natürliche *AvaII*-Aktivität verloren hat. So zeigt sich bei pUC19 kein *AvaII*-Verdaumuster mehr (222bp + 2464bp). Es ist lediglich der Beginn einer Linearisierung des Plasmides vor einem zunehmenden Schmier zu beobachten. Das ist typisch für eine unspezifische Endonuklease.



**Abbildung 36: Verdau von pUC19 mit R.*Hgi*BI S176N Δ24.** Dargestellt sind verschiedene Zeitpunkte (von 10 bis 120min). Verdaut wurde bei 37°C und im Puffer 1 von NEB. Als Vergleich dient pUC19 verdaut mit *AvaII* (A) und die unverdaute Probe (U). Als Marker (M) wurde der Marker 1kb ladder von Fermentas verwendet.

Auch bei dem Verdau von pKF10 mit R.*Hgi*BI S176N Δ24 war lediglich eine Linearisierung des Plasmides zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dieses Muster wurde auch bei 47°C und Hochsalz-Bedingungen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Trotzdem wurde für dieses Enzym die Nebenaktivität (vgl. 4.5.2) untersucht. Hierzu wurde sowohl pUC19, als auch pKF10 mit R.*Hgi*BI S176N Δ24 verdaut und einige dieser Proben für die Bestimmung der Nebenaktivität weiterverwendet. Dabei konnte keinerlei signifikante Nebenaktivität ermittelt werden. Damit ist aufgeklärt, dass bei R.*Hgi*BI S176N Δ24 die *AvaII*-Aktivität verlorengegangen ist, ohne dass eine Nebenaktivität entstanden ist.

Um jeglichen Einfluss der S176N-Mutation auszuschließen, wurde die 24bp Deletion in den wildtypischen pBI-His integriert (Verdau beider Plasmide mit *BsrGI/BglII*). Dieses Plasmid wurde pBI-His Δ24 genannt und wurde in pHK662/HB101 transformiert. Das resultierende Enzym wurde als R.*Hgi*BI Δ24 bezeichnet und über His-Tag-Aufreinigung isoliert. Wie bei R.*Hgi*BI S176N Δ24 zeigte auch dieses Enzym keine *AvaII*-Aktivität mehr. Die Nebenaktivitäts-Bestimmung mit pKF10 führte zwar zu einer guten Linearisierung, aber anschließend nur zu einem grünen Klon. Die Sequenzierung ergab statt GAACC-Aktivität eine unspezifische Aktivität (vgl. Ergebnisse R.*Hgi*BI WT in Tabelle 47).

Insgesamt ließ sich aus diesen negativen Ergebnissen für die  $\Delta 24$ -Deletion sowohl für den Wildtyp als auch für die S176N-Mutante feststellen, dass der deletierte Bereich 103 bis 110 definitiv in die spezifische DNA-Erkennung sowohl der Haupt- als auch Nebenaktivität involviert ist. Ob das durch Änderung der Tertiärstruktur oder tatsächlich durch das Fehlen spezifischer Wechselwirkungen hervorgerufen wird, lässt sich an dieser Stelle nicht sagen.

#### 4.4.3 OrfC Varianten, Mutanten *M.HgiBI*

Zusätzlich zu der Herstellung von *R.HgiBI* S176N (vgl. Abschnitt 4.3), sollte überprüft werden, ob dieselbe Mutante auch unter Schutz der homologen Methyltransferase *M.HgiBI* hergestellt werden kann. Da dies nicht mit der  $\text{LacZ}_\alpha$ -Fusion von *M.HgiBI* möglich gewesen ist (vgl. 4.3), sollten andere Translationsvarianten des Wildtyps *M.HgiBI* und einer Mutante von *M.HgiBI* mit höherer GGSCC-Nebenaktivität mit der Mutante *R.HgiBI* S176N kombiniert werden. Schließlich sollte auch der Einfluss des kleinen Leserahmens *C.HgiEI* untersucht werden. Die Verwendung dieses Leserahmens lässt Rückschlüsse für den homologen Leserahmen *C.HgiBI* zu, da diese beiden Leserahmen in der Aminosäuresequenz identisch sind und auf DNA-Ebene lediglich einige stille Mutationen als Abweichungen aufweisen. Bisher wurde der Effekt von *C.HgiEI* lediglich auf die Wildtyp-Situation von *RM.HgiBI* überprüft (Plasmid pBI-His + OrfC, vgl. Abbildung 35). In einem Restriktionsverdau erwies es sich, dass die Methylierungsaktivität von *M.HgiBI* in pBI-His + OrfC etwas höher ist, als in pBI-His. (Daten nicht gezeigt).

In diesem Sinne wurden folgende Kombinationen mit *R.HgiBI* S176N überprüft:

1. *M.HgiBI* als Direkt-Stopp-Konstrukt (vgl. Tabelle 17)
2. *M.HgiBI* als ATGA-Konstrukt (vgl. Tabelle 17)
3. *M.HgiBI* A289V G290D als  $\text{LacZ}_\alpha$ -Fusion (vgl. Tabelle 17)
4. *M.HgiBI* A289V G290D als Direkt-Stopp-Konstrukt (vgl. Tabelle 17)
5. *C.HgiEI* (82AA, als  $\text{LacZ}_\alpha$ -Fusion (+11AA)) + *M.HgiBI*
6. *C.HgiEI* (82AA, als  $\text{LacZ}_\alpha$ -Fusion (+11AA)) + *M.HgiEI*
7. *C.HgiEI* (82AA, als  $\text{LacZ}_\alpha$ -Fusion (+11AA)) + *M.HgiEI* wt + *R.HgiEI* I119T N223I (auch *R.HgiEI* TNI genannt, vgl. Abschnitt 4.5.1)

*R.HgiEI* I119T N223I ist die Mutante von *R.HgiEI*, die mit *R.HgiBI* S176N an den Positionen 119, 176 und 223 identisch ist. Die Herstellung dieser Kombinationen und die Quellen der entsprechenden Ausgangsplasmide sind in Tabelle 42 angegeben. Die Nutzung des kleinen

Leserahmens *C.HgiEI* anstelle von *C.HgiBI* erweist sich als praktisch, da der entsprechende DNA-Abschnitt für *C.HgiEI* einfacher zu isolieren ist.

**Tabelle 42: Herstellung weiterer Kombinationen mit *R.HgiBI* S176N – Plasmid-Grundlagen.**

Nummer	Ausgangsplasmide		Verwendete Schnitte
	Großes Fragment	Kleines Fragment	
1.	pBI-His Dir <sup>3</sup>	pKF3mut <sup>3</sup>	<i>BsrGI, PstI</i>
2.	pBI-His ATGA	/ <sup>†</sup>	/ <sup>†</sup>
3.	pKF7 <sup>3</sup>	pKF3mut <sup>3</sup>	<i>BsrGI, PstI</i>
4.	pKF3mut <sup>3</sup>	pM. <i>HgiBI</i> A289V G290D <sup>2</sup>	<i>EcoRI, MvaI</i> 269I
5.	pBI-His + OrfC <sup>3</sup>	pKF3mut <sup>3</sup>	<i>BsrGI, PstI</i>
6.	pKF19	pKF3mut	<i>BsrGI/PstI</i>
7.	pKF19 <sup>3</sup>	pEI-His NI <sup>1</sup>	<i>BsrGI, PstI</i>

Abkürzungen: <sup>1</sup>= Plasmid wurde durch BLUM (1995) hergestellt, <sup>2</sup>= Plasmid wurde in der eigenen Diplomarbeit hergestellt, <sup>3</sup>= Plasmid wurde in dieser Arbeit hergestellt, <sup>†</sup>= Dieser Klon wurde durch inverse PCR mit der Mutation S176N versehen.

In Tabelle 43 sind die für die in Tabelle 42 verwendeten Ausgangsplasmide dargestellt. Die Herstellung des Plasmids pKF3mut ist in Abschnitt 4.3 dargestellt, und wird daher hier nicht näher erläutert. Die Herstellung der fünf anderen Ausgangsplasmide gelang nur teilweise ohne Probleme. Das Konstrukt pBI-His + OrfC konnte sowohl in BL21-Zellen, als auch in pHK662/HB101-Zellen erhalten werden. Bei pKF7 war die Etablierung lediglich in BL21-Zellen erfolgreich. pBI-His ATGA wurde nach den Ergebnissen aus Abschnitt 4.1.1 nur in BL21 transformiert. Das Plasmid pBI-His Dir konnte nur nach Vormethylierung der Zellen mit pHK662/HB101 hergestellt werden. In SURE<sup>®</sup>-Zellen war dieses Konstrukt nicht zu erhalten. pKF19 wurde aufgrund der Ergebnisse von BLUM (1995) nur in pHK662/HB101-Zellen transformiert. Die Methylierungsaktivität an der Position GGSCC wurde bei vier Ausgangsplasmiden über einen Verdau mit *Sau96I* bestimmt.

Tabelle 43: Ausgangsplasmide für pBI-His Dir, pBI-His + OrfC, pKF7 und pKF19.

Name	Ausgangsvektoren		Verwendete Schnitte	MTase	GGSCC Methylierung °	Abbildung
	Großes Fragment	Kleines Fragment				
pBI-His Dir	pBI-His <sup>1</sup>	pBIM-5 <sup>2</sup>	<i>EcoRI</i> , <i>Mva</i> 1269I	<i>M.HgiBI</i>	n.d.	Abbildung 56
pBI-His + OrfC	pBI-His <sup>1</sup>	pEI-His <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i>	<i>M.HgiBI</i>	(+)	Abbildung 35
pBI-His ATGA	pBI-His <sup>1</sup>	ATGA BI <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	<i>M.HgiBI</i>	++	Abbildung 55
pKF7	pBI-His <sup>1</sup>	pM. <i>HgiBI</i> A289V G290D <sup>2</sup>	<i>HindIII</i> , <i>Mva</i> 1269I	<i>M.HgiBI</i> A289V G290D	+	Wie pBI-His (Abbildung 24), nur Mutation <i>M.HgiBI</i> A289V G290D
pKF19	pBI-His + OrfC <sup>3</sup>	pEI-His <sup>1</sup>	<i>NcoI</i> , <i>BsrGI</i>	<i>M.HgiEI</i>	n.d.	Abbildung 57

Abkürzungen: <sup>1</sup>= Plasmid wurde durch Erwin Blum hergestellt, <sup>2</sup>= Plasmid wurde in der Diplomarbeit hergestellt, <sup>3</sup>= Plasmid wurde in dieser Arbeit hergestellt. °=Die Methylierungsaktivität der Sequenz GGSCC wurde durch einen Verdau mit *Sau96I* bestimmt und immer mit pBI-His verglichen. n.d. =nicht bestimmt. ++= Methylierung der Sequenz GGSCC sehr viel höher als bei pBI-His, += Methylierung der Sequenz GGSCC höher als bei pBI-His, (+)= Methylierung der Sequenz GGSCC nur etwas stärker als bei pBI-His

Die laut Tabelle 42 hergestellten Kombinationen wurde in pHK662/HB101-Zellen transformiert. Die Kombination mit pBI-His Dir wurde zusätzlich in pKF26/HB101-Zellen ohne Erfolg versucht. Von den sieben Kombinationen aus Tabelle 42 konnte nur vier erhalten und etabliert werden. Nur die Etablierung von *R.HgiEI* TNI gestaltete sich hier als etwas schwieriger (vgl. 4.5.1). Diese vier Kombinationen sind in Tabelle 44 mit „JA“ klassifiziert. Die Plasmide von drei dieser Kombinationen (pKF43, pKF20 und *R.HgiEI* TNI) wurden komplett übersequenziert, um zusätzliche Mutationen in Endonuklease bzw. Methyltransferase ausschließen zu können. Es wurden keine weiteren Mutationen gefunden.



**Tabelle 44: Liste der Kombinationen von R.HgiBI S176N mit M.HgiBI, M.HgiBI A289V D290G und Einfügen von C.HgiEI.** Die Nummerierung der einzelnen Kombinationen folgt der auf Seite 97 dargestellten.

Nummer	C.HgiEI	MTase (Mutation)	Anschluss MTase	Klonierbar mit S176N?	Vormethyliert?	Stamm <sup>°</sup>
1.	X	M.HgiBI	Direkt-Stop	NEIN	???	/
2.	X	M.HgiBI	ATGA	NEIN	???	/
3.	X	M.HgiBI (A289V G290D)	LacZ <sub>α</sub> -Fusion	NEIN	???	/
4.	x	M.HgiBI (A289V G290D)	Direkt-Stopp	JA	pHK662	pKF43
5.	√	M.HgiBI	Eigener Promotor	JA	pHK662	pKF20
6.	√	M.HgiEI	Eigener Promotor	JA	n.d.	pKF45
7.	√	M.HgiEI	Eigener Promotor	JA	NEIN	R.HgiEI TNI

√= C.HgiEI vorhanden X= C.HgiEI nicht vorhanden, ???= Benötigte Vor-Methylierung konnte aufgrund nicht erhaltener Klone nicht ermittelt werden, n.d.= nicht bestimmt. °= endgültige Stammbezeichnung

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen

- R.HgiBI S176N (oder R.HgiEI TNI) kann sowohl mit M.HgiBI als auch mit M.HgiEI kloniert werden, wenn der kleine Leserahmen C.HgiEI vorhanden ist. Offenbar wird die LacZ<sub>α</sub>-Anbindung an die 82 Aminosäuren in der Funktion des orfC toleriert.
- R.HgiBI S176N kann mit M.HgiBI A289V G290D kloniert werden, wenn eine Direkt-Stopp-Anbindung der Methyltransferase vorliegt. In dieser Kombination ist die Anwesenheit des kleinen Leserahmens nicht erforderlich.
- Alle anderen Konstrukte sind offenbar instabiler oder für die Zellen toxisch.

Aus den in Tabelle 44 dargestellten Ergebnissen lässt sich die in Abschnitt 4.4.1.1 gestellte Hypothese Nummer eins belegen: Die LacZ<sub>α</sub>-Fusion der Methyltransferase M.HgiBI A289V G290D ist im Gegensatz zu derselben Mutante als Direkt-Stopp-Konstrukt in der Lage, die Mutante R.HgiBI S176N zu kontrollieren. Aus diesem Grunde muss man sagen, dass der LacZ<sub>α</sub>-Anhang für die Funktion der Methyltransferasen beeinträchtigend ist.

## 4.5 Nebenaktivität der Restriktionsenzyme

Jens KRIESE (unpubl.) aus unserer Arbeitsgruppe konnte ermitteln, dass die Endonuklease *R.HgiBI* eine Nebenaktivität hat. Bei allen Restriktionsverdau mit *R.HgiBI* traten substöchiometrische Zusatzbanden auf. Die Bestimmung der Schnittsequenz wurde nicht abgeschlossen. Daher sollte in dieser Arbeit ermittelt werden, ob dieser Nebenaktivität von *R.HgiBI* eine spezifische Erkennungssequenz zugrunde liegt. In diese Untersuchung sollten auch bestimmte *R.HgiBI*- und *R.HgiEI*-Mutanten einbezogen werden. Bei der entsprechenden Mutagenese lag der Schwerpunkt wieder auf den Positionen 119, 176 und 223, denn nur an diesen Positionen unterscheiden sich *R.HgiBI* und *R.HgiEI* voneinander. Einige dieser Mutanten wurden bereits durch BLUM (1995) hergestellt. Die Herstellung der fehlenden Mutanten ist in Abschnitt 4.5.1 dargestellt. In Abschnitt 4.5.2 ist die Ermittlung der Nebenaktivitäten und die dazu entwickelte Methode dargestellt.

### 4.5.1 Herstellung von *R.HgiBI*/*R.HgiEI*-Mutanten

Die neuen Mutanten von *R.HgiBI* und *R.HgiEI* wurden direkt aus den Plasmiden pBI-His und pEI-His hergestellt. Hierfür wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurden die Mutationen über inverse PCR eingeführt (vgl. Abschnitt 3.5.2). Diese Methode wurde sowohl bei der Herstellung der Mutanten *R.HgiBI* T119N und *R.HgiBI* T119I (die dazugehörigen Primersequenzen können der Tabelle 6 entnommen werden) als auch bei der Herstellung der Mutante *R.HgiBI* S176N verwendet (vgl. Abschnitt 4.3).

Wenn möglich wurde zum anderen die Tatsache ausgenutzt, dass die drei Codons, in denen sich *R.HgiBI* und *R.HgiEI* unterscheiden, durch drei verschiedene Schnittstellen trennbar sind. So kann man zumindest die Positionen 119 bzw. 176/223 gegenseitig nach Restriktionsverdau *BsrGI*/*BglII*/*PstI* umsetzen. Details dieses Vorgehens sind für zahlreiche Konstrukte identisch. Sie sind in der folgenden Tabelle 45 aufgeführt.

**Tabelle 45: Details der systematischen Darstellung der Mutanten von *R.HgiBI*, *R.HgiEI* und *R.HgiCII*.** Aufgeführt sind die erneut überprüften Wildtypen und die diversen Mutanten zusammen mit deren Herstellungsmethode.

			Position				
	Basis*	Typ	119	176	223	Herstellung Plasmide	Komplikation
Wildtyp	R.HgiBI	/	Thr	Ser	Ile	Wildtyp (BLUM 1995)	Nein
	R.HgiCII	/	Asn	Asn	Ile	Wildtyp (BLUM 1995)	Nein
	R.HgiEI	/	Ile	Asn	Asn	Wildtyp (BLUM 1995)	Nein
Einzelmutation	R.HgiCII	→ BI 176	Asn	Ser	Ile	BLUM (1995)	Nein
Einzelmutationen	R.HgiBI	→ CII 119	Asn	Ser	Ile	Inverse PCR	Nein
		→ EI 119	Ile	Ser	Ile	Inverse PCR	Nein
		→ CII 176	Thr	Asn	Ile	Inverse PCR	Mit
		→ EI 176	Asn	Ile			
		→ CII 223	Thr	Ser	Ile	Wildtyp (BLUM 1995)	Nein
		→ EI 223	Thr	Ser	Asn	BLUM (1995)	Mit
Einzelmutationen	R.HgiEI	→ BI 119	Thr	Asn	Asn	Restriktionsverdau	Nein
		→ CII 119	Asn	Asn	Asn	Restriktionsverdau	Mit
		→ BI 176	Ile	Ser	Asn	BLUM (1995)	Nein
		→ CII 176	Ile	Asn	Asn	Wildtyp (BLUM 1995)	Nein
		→ BI 223	Ile	Asn	Ile	BLUM (1995)	Mit
		→ CII 223					
Doppelmutationen	R.HgiEI	→ BI	Ile	Ser	Ile	BLUM (1995)	Nein
		→ BI	Thr	Asn	Ile	Restriktionsverdau	Mit
		→ BI	Thr	Ser	Asn	Restriktionsverdau	Nein
Tripelmutationen		→ BI	Thr	Ser	Ile	Restriktionsverdau	Nein

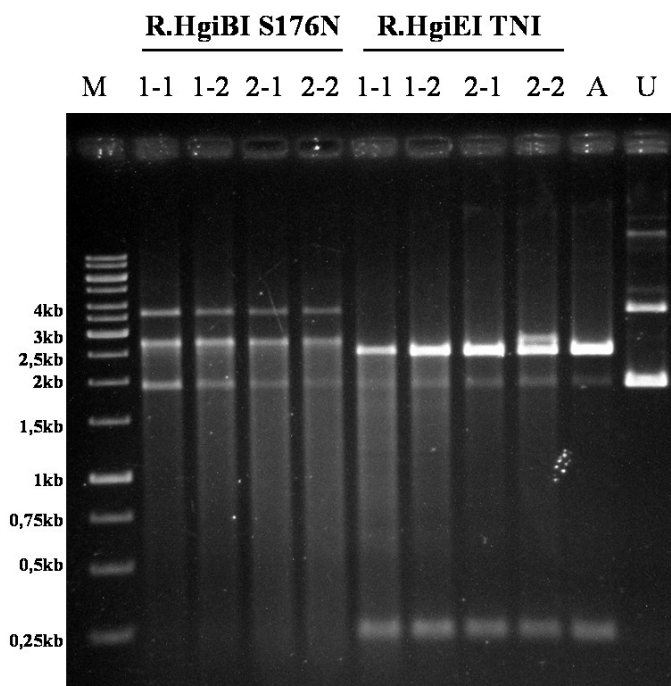
Orange markiert sind Positionen, an denen diese Mutante der Sequenz von *R.HgiCII* entspricht, grün solche, an denen die Mutante *R.HgiBI* entspricht, blau solche, an denen dies der Sequenz von *R.HgiEI* entspricht.

Die Transformation wurde immer in pHK662/HB101-Zellen durchgeführt. Wie in Tabelle 45 angegeben verlief die Herstellung der meisten Mutanten ohne Komplikationen. Im Rahmen dieser Arbeit soll nur auf die Mutanten eingegangen werden, bei deren Herstellung Komplikationen auftraten.

Zwei dieser Mutanten konnten erst dann stabil etabliert werden, nachdem die Ampicillin-Konzentration im LB-Medium von 100µg/ml auf 300µg/ml erhöht wurde. Dies gilt für *R.HgiEI* I119T N223I (weiter als *R.HgiEI* TNI bezeichnet) und *R.HgiEI* I119N. Auf das Problem bei der Klonierung von *R.HgiBI* S176N wurde bereits im Abschnitt 4.3 speziell eingegangen.

Die Mutanten besaßen automatisch einen His-Tag und konnten so leicht in *E.coli* überexprimiert und aufgereinigt werden (vgl. Abschnitt 3.7). Die Expression gelang in allen Fällen ohne Besonderheiten. Alle hergestellten Mutanten wurden zunächst durch Inkubation mit dem Standard-Plasmid pUC19 auf ihre Aktivität überprüft. Als Beispiel hierfür ist der Verdau von

pUC19 mit *R.HgiEI* TNI in Abbildung 37 illustriert. Dabei weist *R.HgiEI* TNI einen typischen *AvaII*-Verdau auf. Dies ist an dem Auftreten einer 222bp-Bande deutlich erkennbar. Diese Bande fehlt bei dem in Abbildung 37 dargestellten Verdau mit *R.HgiBI* S176N. Hier ist aufgrund der geringen Proteinkonzentration nur linearisiertes Material zu finden.

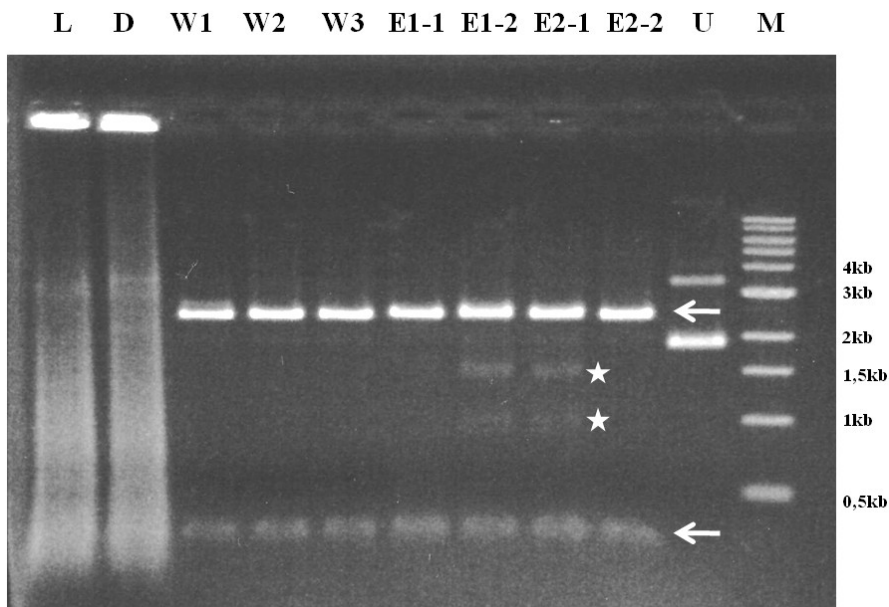


**Abbildung 37: Verdau von pUC19 mit *R.HgiEI* TNI und *R.HgiBI* S176N.** Bei diesem Verdau wurde pUC19 mit verschiedenen Eluaten der His-Tag-Aufreinigung der oben genannten Enzyme verdaut. Die Bezeichnungen 1-1, 1-2, 2-1 und 2-2 stellen dabei die im Methodenteil dargestellten Eluat-Fraktionen der His-Tag-Aufreinigung dar. In allen Ansätzen wurde 1µl der Eluate verwendet. Die Ansätze wurden für 2h bei 47°C inkubiert. Als Vergleich dient ein Verdau von pUC19 mit *AvaII* (A), welcher für 2h bei 37°C inkubiert worden ist, auch hier wurde 1µl Enzym eingesetzt. Als zweite Kontrolle ist unverdautes pUC19 mit eingesetzt (U).

*R.HgiEI* TNI konnte im Vergleich zu dem sequenzidentischen Enzym *R.HgiBI* S176N besser exprimiert werden. Dies liegt vermutlich daran, dass *R.HgiBI* S176N nur von dem eigenen, schwachen Promotor abgelesen wird (vgl. 4.3), wohingegen *R.HgiEI* TNI auch vom Promotor der Methyltransferase abgelesen wird. Im Falle von *R.HgiEI* TNI ist der kleine Leserahmen *C.HgiEI* mit auf dem Plasmid kodiert und könnte somit ebenfalls eine Rolle bei der höheren Expression von *R.HgiEI* TNI spielen.

#### 4.5.2 Ermittlung der Nebenaktivität

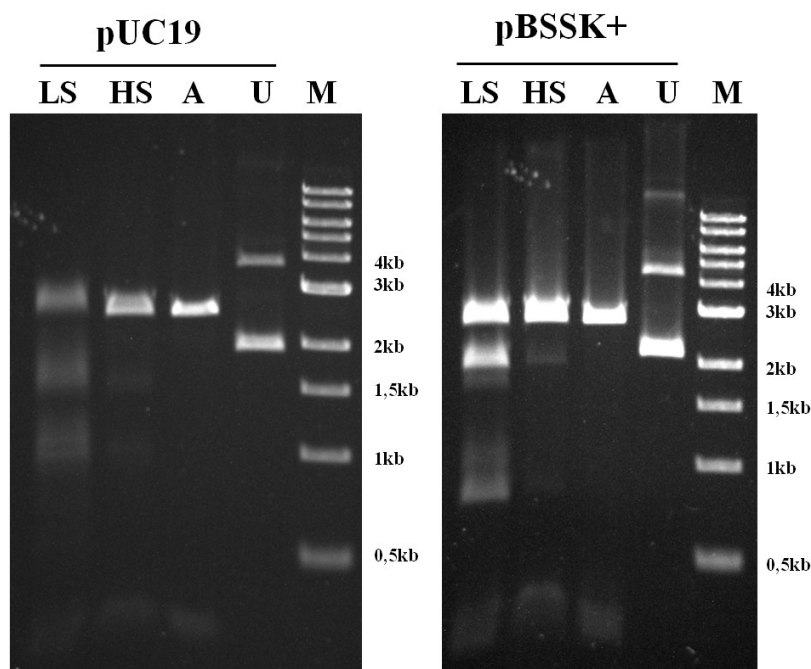
Die Nebenaktivität von *R.HgiBI* wurde hier zunächst im Zusammenhang mit der 300ml His-Tag-Aufreinigung bei einem Testverdau mit pUC19 beobachtet. Bei einem Testverdau der Fraktionen der His-Tag-Aufreinigung waren bei zwei der Elutionsfraktionen mit der höchsten Enzymkonzentration (Eluate E1-2, E2-1) eindeutig Nebenbanden zu beobachten (vgl. Abbildung 38). Derselbe Effekt war bei den 60ml His-Tag-Aufreinigungen nicht zu beobachten. Der Grund dafür liegt vermutlich in der unterschiedlichen Salzlast der einzelnen Fraktionen.



**Abbildung 38: Erster Hinweis auf eine Nebenaktivität von *R.Hgi*BI in dieser Arbeit.** Dieser Verdau wurde mit pUC19 und 2µl aller Fraktionen einer 300ml His-Tag-Aufreinigung bis auf die Fraktion „Gesamt“ durchgeführt. Abkürzungen: L= Lysat, D= Durchfluss, W1= Wasch 1, W2= Wasch 2, W3= Wasch 3, E1-1, E1-2, E2-1, E2-2= Eluate. Mit einem Stern markiert sind unerwartete Produkte, mit weißen Pfeil die gewöhnlichen *Ava*II-Verdauprodukte. M= 1kb ladder von NEB

Entsprechend wurde der Effekt zunächst im Hochsalzpuffer gesehen. Er trat aber klarer auf, als *R.Hgi*BI in seinen physiologischen Inkubations-Puffer umgesetzt wurde (Niedrigsalzpuffer, Puffer 1 von NEB, BLUM 1995). Offenbar spielt auch die Inkubations-Temperatur eine Rolle. KRIESE (unpubl.) beobachtete ein Optimum für die Nebenaktivität von *R.Hgi*BI bei 47°C statt bei 37°C. Deshalb wurde in dieser Arbeit bis auf wenige Ausnahmen durchgehend diese Temperatur verwendet.

Die Nebenaktivität wurde nicht nur in Verbindung mit pUC19 beobachtet, sondern ergab sich noch eindeutiger bei der Spaltung von pBSSK+ (vgl. Abbildung 39). Auch dort konnten neben den typischen *Ava*II-Banden (222bp und 2464bp bei pUC19, 222bp und 2739bp für pBSSK+) zusätzliche Banden beobachtet werden.

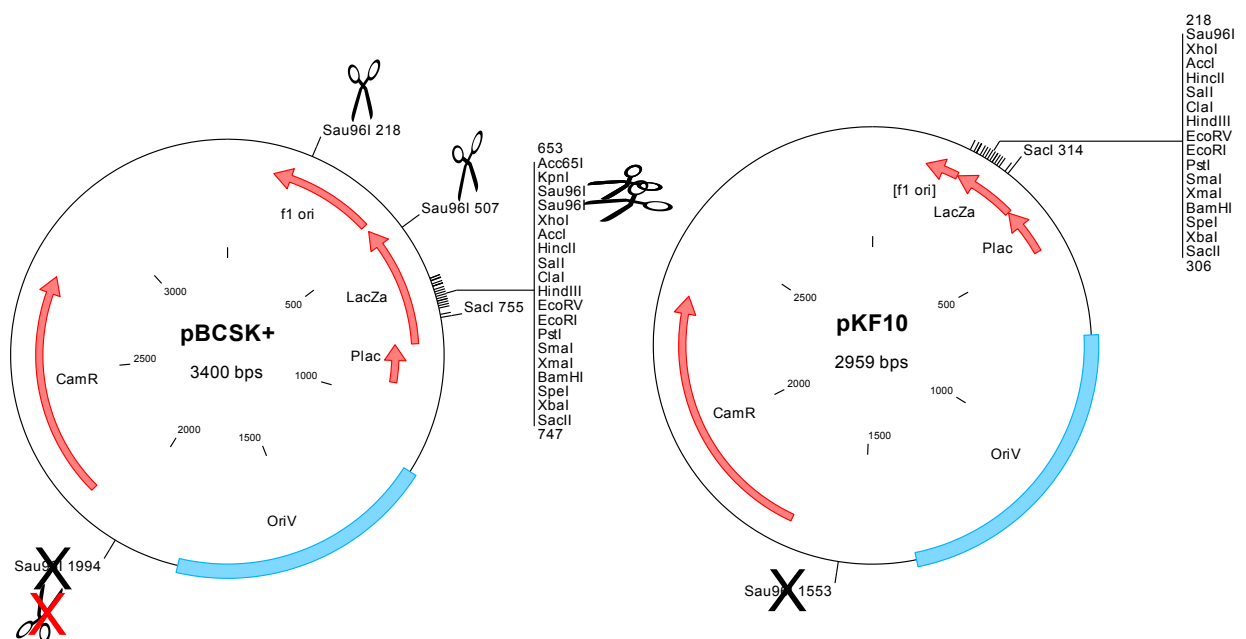


**Abbildung 39: Nebenaktivität von *R.Hgi*BI bei Niedrigsalz (LS) und Hochsalzbedingungen (HS) mit pUC19 und pBSSK+.** Verglichen wird der Verdau mit einer unverdauten Probe (U) und mit der *Ava*II-Spaltung (A) von pUC19 und pBSSK+. Verwendet wurde das Eluat E1-2 von einer 300ml Expression und His-Tag Aufreinigung von *R.Hgi*BI. Die Glycerinkonzentration betrug in diesem Ansatz 12%. M= 1kb ladder von NEB.

Zunächst wurde vermutet, dass diese Nebenaktivität eine GGSCC-Nebenaktivität sein könnte, da diese Nebenaktivität ja zuvor bei den Methyltransferasen beobachtet worden ist. Um die genaue Position dieser Nebenaktivität auf den Plasmiden pUC19 bzw. pBSSK+ festzustellen, sollten die entstehenden Banden aus dem Gel isoliert werden. Nach Subklonierung sollte die Endsequenz bestimmt werden. Dieses Vorhaben scheiterte allerdings an der geringen Menge, die aus dem Gel isoliert wurde.

Eine alternative Methode wurde bereits von Jens KRIESE (unpubl.) durchgeführt, indem aus dem Standard-Plasmid pBSSK+ über die Primer E1-FW und E1-RV (Sequenzen siehe Tabelle 7) ein kleines Fragment mit einer GGSCC-Stelle per PCR amplifiziert wurde. Dieses kleine PCR-Fragment sollte dann mit den einzelnen Enzymen geschnitten werden. Die resultierenden Fragmente sollten aufgereinigt und direkt in der Sequenzierung eingesetzt werden. Jens KRIESE (unpubl.) konnte auf diesem Weg zwei Sequenzen erhalten. Diese Strategie war aber hier nicht erfolgreich. Beim Verdau des entsprechenden 439bp großen Fragmentes waren zwar Fragmente zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Der Hintergrund war aber so stark, dass diese Produkte nicht für die Sequenzierung eingesetzt werden konnten. Aus diesem Grunde wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

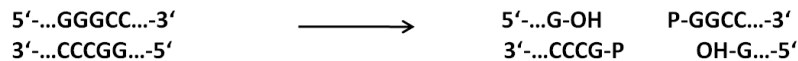
Um diese Nebenaktivität elegant greifbar zu machen, wurde eine ganz neue Methode entwickelt. Hierzu wurde zunächst das Standard-Plasmid pBCSK+ (Stratagene) als Plasmid ohne jede *AvaII*-Schnittstelle verwendet, um nicht durch die Hauptaktivität von *R.HgiBI* bzw. von den anderen Endonukleasen gestört zu werden. Da davon ausgegangen wurde, dass es sich bei der Nebenaktivität von *R.HgiBI* um GGSCC handelt, wurden bei diesem Plasmid die ursprünglich fünf GGSCC-Schnittstellen durch Verdau mit *Sau96I* (Erkennung GGNCC) auf zwei Schnittstellen reduziert. Dabei wurde ein 441bp Fragment deletiert. Einer der übriggebliebenen GGSCC-Schnitte war bei der Verwendung von SURE<sup>®</sup> als Transformationsstamm durch Dcm methyliert und sollte folglich nicht geschnitten werden. Damit konnte im Prinzip ein Plasmid mit einer singulären GGSCC-Schnittstelle erhalten werden (vgl. Abbildung 42, Spur 4). Das so hergestellte Plasmid wurde pKF10 genannt (vgl. Abbildung 40).



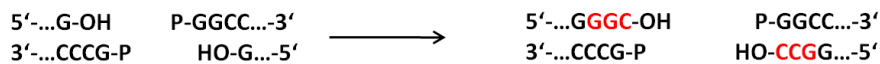
**Abbildung 40: Herstellung des Plasmids pKF10.** Die durchgestrichenen *Sau96I*-Erkennungssequenz kann nicht geschnitten werden, weil sie mit der Dcm-Methylierung überlappt.

Der Plasmid pKF10 konnte in SURE<sup>®</sup> ohne Probleme erhalten werden. Das weitere Vorgehen zur Bestimmung der Nebenaktivität der Endonukleasen ist in Abbildung 41 für die singuläre *Sau96I*-Schnittstelle exemplarisch dargestellt.

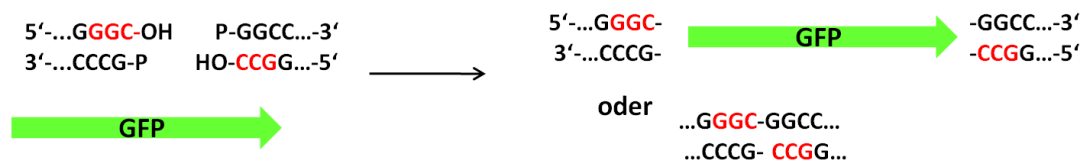
- pKF10 mit *Sau96I* schneiden, es entstehen 5'-Überhänge:



- Auffüllen der 5'-Überhänge mit Klenow-Polymerase (**rot**: aufgefüllte Überhänge):



- Ligieren mit *blunt-end* DNA-Fragment, welches GFP-Gen unter der Kontrolle des  $P_{lac}$ -Promotors enthält (GFP wird somit unabhängig von anderen Promotoren exprimiert), es entstehen zwei verschiedene Ligationsprodukte. Hier ist eine Orientierung des GFP-Gens gezeigt.



- Transformieren der Ligationsprodukte ergibt wenige grüne Klone:



- Grüne Klone picken, Plasmid isolieren, und die zum GFP-Gen benachbarten Sequenzen mit nach außen hin weisenden Primern bestimmen:



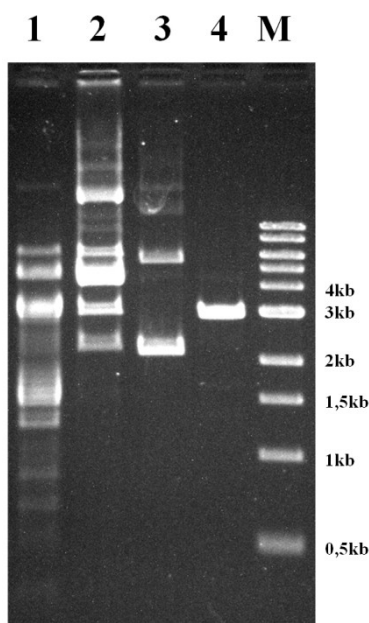
**Abbildung 41: Darstellung der Methode zur Bestimmung der Nebenaktivität von Restriktionsenzymen.** Die Methode ist hier am Beispiel von *Sau96I* dargestellt (Erkennungssequenz GGNCC), Legende: gelber Pfeil= Sequenzierprimer in *reverse*-Richtung, blauer Pfeil= Sequenzierprimer in *forward*-Richtung

Zunächst wird das Plasmid pKF10 mit der entsprechenden Endonuklease geschnitten. Daraufhin werden die von der Endonuklease *Sau96I* produzierten 5'-Überhänge mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Die so entstehenden blunt-end Plasmid-Fragmente werden nun mit einem blunt-end GFP-Gen-DNA-Fragment ligiert. Dieses in Zukunft als GFP-Fragment bezeichnete DNA-Fragment wurde mit *SmaI* und *PvuII* aus einem hier hergestellten Plasmid (pKF11) herausgeschnitten und über Gelextraktion isoliert. Die Herstellung des Plasmids pKF11 ist auf Seite 152 genauer dargestellt. Die Besonderheit dieses GFP-Fragmentes ist, dass es einen Lac-Promotor und Lac-Operator besitzt, so dass das GFP-Gen unabhängig exprimiert werden kann. Das Plasmid pKF10 enthält zwar ebenfalls einen Lac-Promotor mit Operator. Aber die GFP-Expression wäre bei der Nutzung dieses Promotors richtungsabhängig gewesen. Außerdem kann das selbsthergestellte GFP-Fragment in jede beliebige Schnittstelle ligiert werden, ohne dass ein Verlust an Effektivität eintreten kann.

Die Ligation eines blunt-end Plasmids mit dem blunt-end GFP-Fragment ist ein kinetisch benachteiligter Vorgang, da es wahrscheinlicher ist, dass der Vektor mit sich selbst ligiert. Bei



höheren Fragment-Konzentrationen konnte die gesuchte Ligation aber in ausreichendem Maß beobachtet werden. Von den so erhaltenen grünen Klonen wird die DNA isoliert und jeweils in beide Richtungen aus dem GFP-Gen heraus sequenziert (mit den Primern GFPstop und StartGFP2, vgl. Tabelle 7). Auf diese Art sollte es elegant gelingen, die Schnittposition und –sequenz von *R.HgiBI* in pKF10 (und somit hoffentlich auch die Nebenaktivität) zu ermitteln. Zur Etablierung dieser Methode wurde pKF10 zunächst mit *R.HgiBI* und als Kontrolle mit *Sau96I* geschnitten. Das Ergebnis dieses Verdauens ist in Abbildung 42 dargestellt. Man kann sofort eindeutige Schnittmuster für *R.HgiBI* sehen. Das Muster war in Spur 1 bei Verwendung der jüngeren Aufreinigung vermutlich wegen (noch) höherer Aktivität der Endonukleasen ausgeprägter. Die Ansätze (1) (*R.HgiBI* ohne Glycerin) und (4) (*Sau96I*-Kontrolle) wurden weiterverwendet.



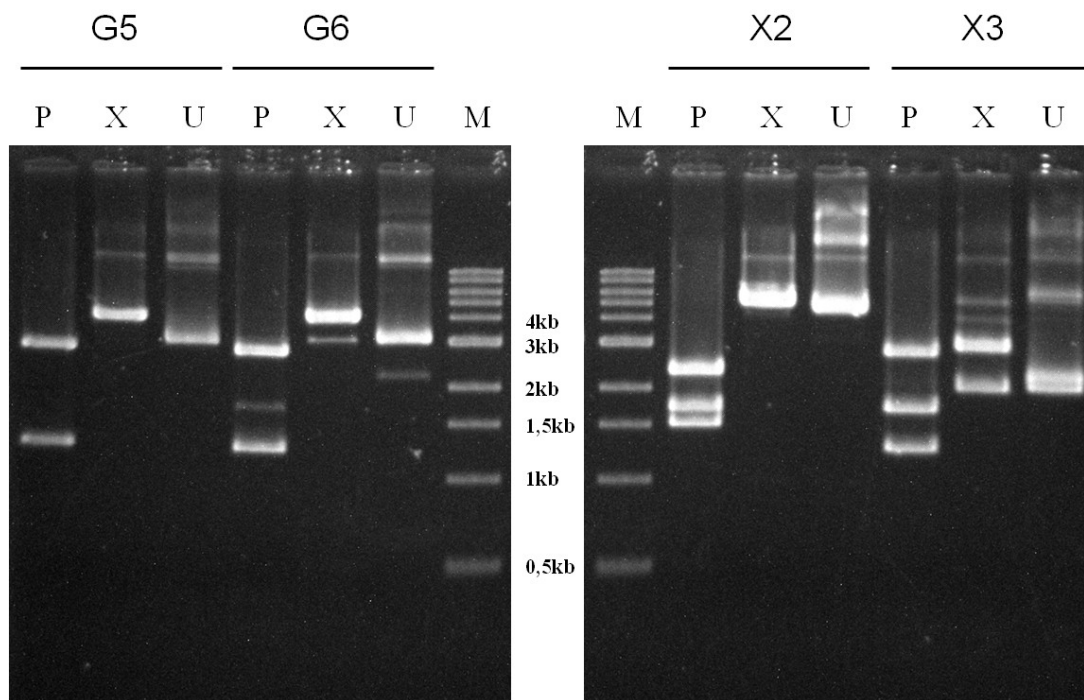
**Abbildung 42: Erster Testverdau von pKF10 mit *R.HgiBI* und *Sau96I*.**

Spur 1 und 2 stellen den Verdau von pKF10 mit dem Eluat E2-1 von zwei unterschiedlichen His-Tag-Aufreinigungen dar. Das in Spur 1 eingesetzte Eluat war nicht mit Glycerin versetzt (eine Woche nach Aufreinigung), wohingegen das in Spur 2 eingesetzte Eluat mit Glycerin versetzt war (Endkonzentration im Eluat 50%, drei Monate nach Aufreinigung). Spur 3 zeigt unverdautes pKF10. Spur 4 zeigt das mit *Sau96I* linearisierte pKF10. Es wurden 6,5µg DNA eingesetzt und ca. 17 Stunden verdaut, *Sau96I* bei 37°C, *R.HgiBI* bei 47°C. M= 1kb ladder von NEB.

Die kompletten Restriktionsansätze wurden zunächst mit 3M Kaliumacetat (pH5,5= Lösung P3 aus Plasmidisolierung) und Isopropanol gefällt (Endkonzentration Kaliumacetat 300mM, Isopropanol 50% v/v). Die entstandenen Fragmente wurden mit dem Klenow-Fragment aus *E.coli* aufgefüllt und das Produkt mit dem GFP-Fragment aus pKF11 ligiert. Die so hergestellten Konstrukte wurden dann in SURE<sup>®</sup> oder HB101-Zellen transformiert und auf Chloramphenicol/IPTG/Xgal-Platten ausgestrichen.

Bei *R.HgiBI* konnten so vier, bei der *Sau96I*-Kontrolle 23 grün leuchtende Klone erhalten werden. Die Ausbeute hierbei war wie erwartet relativ gering. Etwa ein grüner Klon auf mindestens 200 Klone. Drei der *R.HgiBI*-Klone und sechs *Sau96I*-Klone wurden weiter bearbeitet. Zur Größenbestimmung wurden die Klone mit *XbaI* verdaut. Erwartet wurde eine Linearisierung, da das GFP-Fragment keine *XbaI*-Schnittstelle enthält. Zur Bestimmung der „Reinheit“ der Klone

wurde mit PvuII verdaut. So konnte eine Co-Isolierung mit Ausgangsmaterial erkannt werden, da die GFP-Klone relativ wenig Plasmid-DNA ergaben. Der Verdau von je zwei *Sau96I* (G-Klone) und *R.HgiBI*-Klone (X-Klone) ist in Abbildung 43 dargestellt.




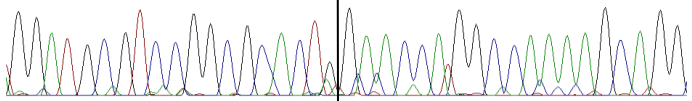
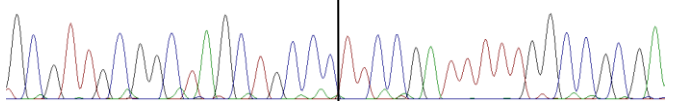
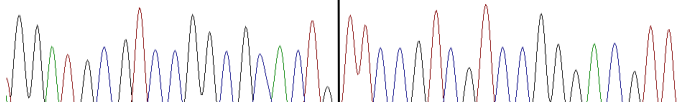
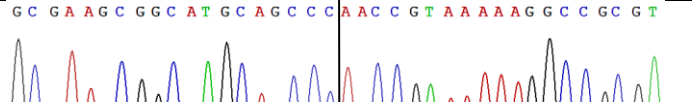
**Abbildung 43:** Verdau von je zwei Klonen der *Sau96I*-Kontrolle (G-Klone) und der *R.HgiBI*-Nebenaktivität (X-Klone). P=*PvuII*-Verdau, X=*XbaI*-Verdau, U= unverdaut, M= 1kb ladder von NEB.

Die über Restriktionsverdau charakterisierten Klone wurden dann mit den Primern GFP-stop und start-GFP2 vom GFP-Gen nach außen hin sequenziert (vgl. Schema in Abbildung 41). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der bekannten Sequenz von pKF10 verglichen. In Tabelle 46 sind die jeweiligen Übergänge für die *R.HgiBI* generierten Fragmente im Detail gezeigt. Die entsprechenden Positionsnummern sind angegeben.

Die Sequenz aus pKF10 wurde stets als aufgefüllte Schnittstelle angesehen. Die Klone G5, G6, X2 und X3 wurden zunächst mit den beiden Primern sequenziert. Die Klone G5 und G6 ergaben das erwartete *Sau96I*-Muster (Daten nicht gezeigt). In Tabelle 46 werden nur die Ergebnisse aus X2 und X3 bzw. die zugehörige Interpretation gezeigt. Drei der vier Sequenzierungen ergaben eine identische Schnittstelle an der Position 744/746. Es handelt sich in allen vier Fällen um die Sequenz GAACC. Sie wird genauso geschnitten, wie die *AvaII*-Sequenz vom Wildtyp geschnitten wird:

Erweiterte Spezifität:	G↓AACC CTTG↑G
<i>AvaII</i> -Aktivität:	G↓GACC CCTG↑G

**Tabelle 46: Ergebnis der Sequenzierung zweier Nebenaktivitätsklone von *R.HgiBI*.** In der oberen Spalte ist das Original-Sequenzierungsergebnis dargestellt, unten die Interpretation daraus. Blau dargestellt sind die Sequenzen von pKF10, welche in den Klonen der Nebenaktivität von *R.HgiBI* nicht vorhanden sind, Schwarz diejenigen, die in den Klonen vorhanden ist. Unterstrichen ist die Sequenz, welche die eventuelle Nebenaktivität von *R.HgiBI* sein könnte.

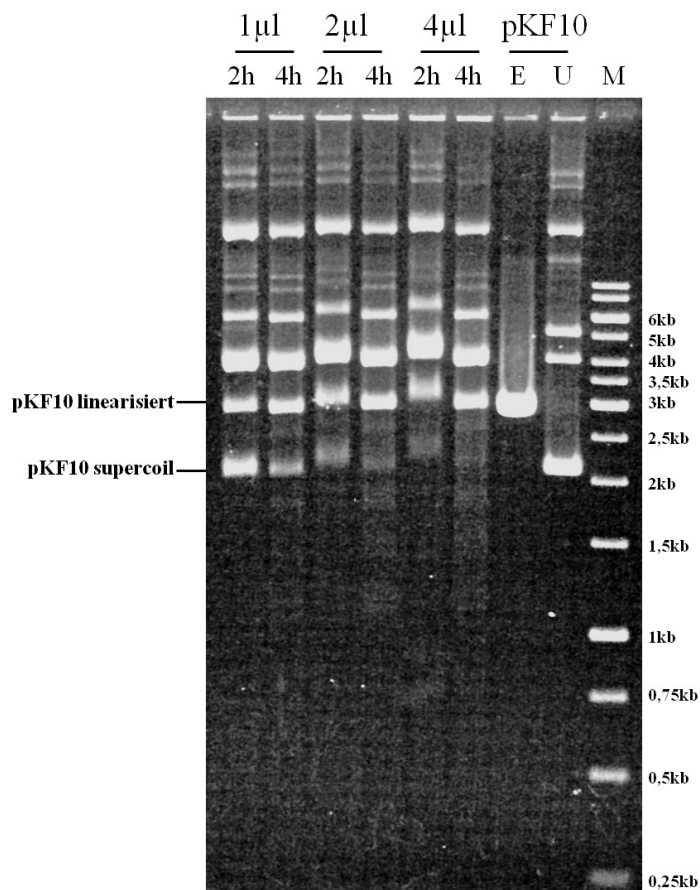
Klon	Primer	Ergebnis		Position in pKF10
				
X2	GFPstop			746
	Interpretation	AAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTAC <u>GGTTCCTGGCCTTTTGC</u>		
X2	StartGFP2			744
	Interpretation	TGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGA <u>AACCGTAAAAAGGCCGC</u>		
X3	GFPstop			2456
	Interpretation	CATAAGCGGCTATTTAACGACCTTGCCTGA <u>AACCGACGACCGGGTCGAA</u>		
X3	StartGFP2			744
	Interpretation	TGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGA <u>AACCGTAAAAAGGCCGC</u>		

Auf die hier dargestellte Art und Weise wurde auch die Nebenaktivität der anderen Endonukleasen bzw. Mutanten ermittelt. Die eingesetzte DNA-Menge war immer 6,5µg. Der Vektor pKF10 wurde entweder aus SURE<sup>®</sup> oder aus BL21 isoliert. Da sich im Laufe der Zeit herausstellte, dass die aus BL21 zu isolierbare Menge höher war als die bei SURE<sup>®</sup>, wurde pKF10 gegen Ende meist nur aus BL21 isoliert. Der Nachteil der fehlenden Dcm-Methylierung war jetzt unerheblich.

Der verwendete Reaktionspuffer wurde nach den bei BLUM (1995) erhaltenen Ergebnissen gewählt.

Das Volumen der eingesetzten Endonuklease-Lösung hing von verschiedenen Faktoren ab: Zum einen hing es davon ab, ob die Enzyme bereits mit Glycerin versetzt waren (50% Endkonzentration) oder nicht. In Gegenwart von Glycerin wurde nur so viel eingesetzt, dass die Glycerinkonzentration im Gesamtansatz 5% nicht überstieg (ansonsten wird die Staraktivität erhöht). Zudem wurde darauf geachtet, dass pKF10 nicht zu lange und zu schnell verdaut wurde.

Dieses wurde durch einen Vergleich mit unverdaulichem pKF10 und linearisiertem pKF10 (z.B. mit *EcoRI*) gewährleistet. Es wurde darauf geachtet, dass zumindest eine Linearisierung von pKF10 bei einem solchen Verdau stattfand. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Bezug auf Gellänge und Laufzeit so optimiert, dass neben den Banden für die Linearisierung stets auch die kleineren Banden aus einer potentiellen Nebenaktivität aufgelöst wurden. Abbildung 44 dient zur Demonstration dieser Optimierung.



**Abbildung 44: Verdau von pKF10 mit R.HgiEI I119N.** Der Verdau wurde jeweils mit 1µl, 2µl und 4µl Enzym durchgeführt für 2 oder 4 Stunden bei 47°C. Abkürzungen: E= pKF10 verdaut mit *EcoRI*, U= pKF10 unverdaut, aber im gleichen Reaktionspuffer für 4h bei 47°C inkubiert, M= 1kb ladder von Fermentas. Das Gel wurde ca. 3h bei 110V laufen gelassen.

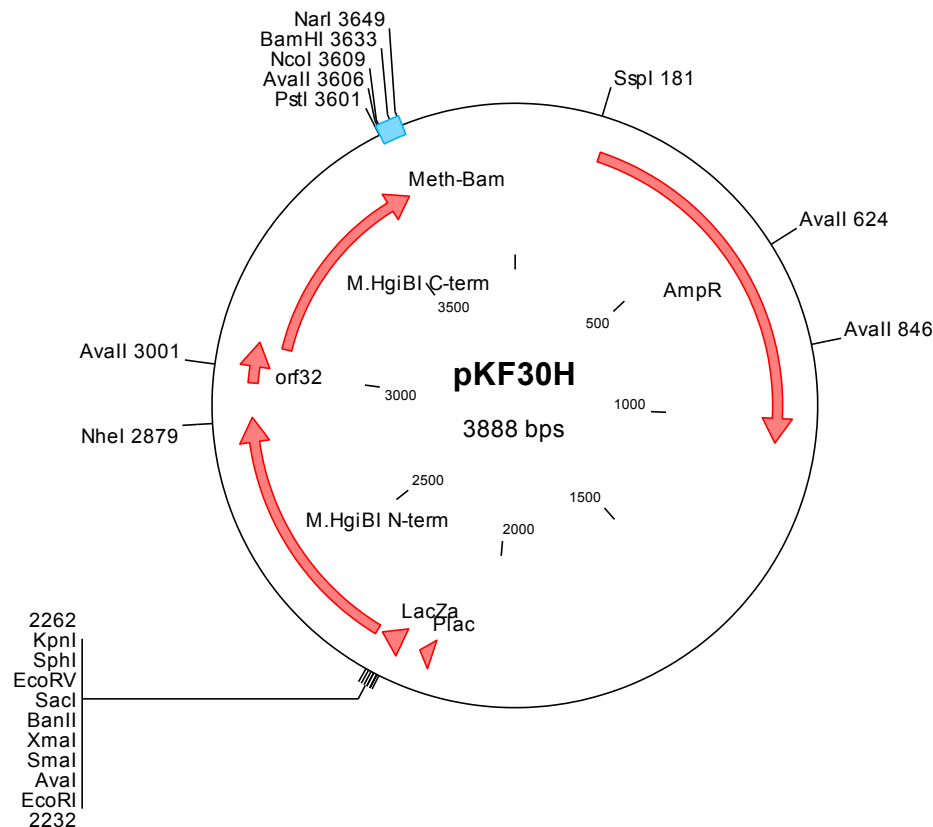
Die Ergebnisse bei der Bestimmung der Nebenaktivität der Endonukleasen und Mutanten ist in Tabelle 47 aufgeführt. Wie man hier sehen kann, ist eine spezifische Nebenaktivität nur in einigen wenigen Fällen zu beobachten. Die Schnittposition bei den einzelnen Nebenaktivitäten war stets identisch mit der der Wildtyp-Nebenaktivität. Besonders eindeutig ist sie im Falle von *R.HgiBI* wt und *R.HgiEI* I119T N176S N223I (auch *R.HgiEI* TNI genannt, in allen drei genannten Positionen wie *R.HgiBI*). Sie zeigen die bereits vorgestellte Nebenaktivität GAACC. Bei *R.HgiCII* konnte keine Nebenaktivität beobachtet werden, auch nicht bei *R.HgiBI* S176N, *R.HgiEI* TNI, *R.HgiEI* N223I (an den Positionen 176 und 223 identisch zu *R.HgiCII* bzw. *R.HgiBI* S176N). Diese Ergebnisse widersprechen der Theorie, dass die Nicht-Klonierbarkeit von *R.HgiBI* S176N darauf zurückzuführen ist, dass eine zusätzliche oder eine andere Nebenaktivität entsteht. Darauf soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

**Tabelle 47: Nebenaktivitäten bei Endonuklease-Wildtypen und –Mutanten.** Grün markiert sind Positionen, die spezifisch für *R.HgiBI* sind, rosa solche, die spezifisch für *R.HgiCII* sind, und blau solche, die spezifisch für *R.HgiEI* sind. Gelb markiert sind spezifische Ergebnisse. °= keinerlei Klone bei Kombination von Fragment mit dem GFP-Fragment entstanden. LS= Nidrigsalzpuffer (Puffer 1 von NEB), HS= Hochsalzpuffer (Puffer R von Fermentas). Die dieser Tabelle zugrunde liegende Original-Daten sind im Anhang ab Seite 155 bis Seite 166 dargestellt.

	Basis*	Type	Position			Ergebnis	Puffer	Spezifität
			119	176	223			
Wildtyp	R.HgiBI	Wildtyp	Thr	Ser	Ile	Spezifisch	LS	14x G↓AACC 5x A↓GACC
	R.HgiCII	Wildtyp	Asn	Asn	Ile	Unspezifisch	LS	1x G↓GACT
							HS	3x G↓GACT 2x C↓CTGG
	R.HgiEI	Wildtyp	Ile	Asn	Asn	Unspezifisch	LS	3x A↓GGCC 3x G↓GCGT
Vorwiegend spezifisch						HS	7x T↓GACC 11x C↓GACC 1x T↓GTCC 1x C↓CTGA	
Einzelmutationen	R.HgiBI	→ CII 119	Asn	Ser	Ile	Unspezifisch	LS	2x G↓AAGC
		→ EI 119	Ile	Ser	Ile	Unspezifisch	LS	1x G↓AAGC
		→ CII 176	Thr	Asn	Ile	Unspezifisch	LS	/
		→ EI 176					HS	/
		→ CII 223	Thr	Ser	Ile	Wildtyp	LS/HS	Siehe Ergebnis Wildtyp
		→ EI 223	Thr	Ser	Asn	Unspezifisch	LS	/
Einzelmutation	R.HgiCII	→ BI 176	Asn	Ser	Ile	unspezifisch	LS	/°
Einzelmutationen	R.HgiEI	→ BI 119	Thr	Asn	Asn	Vorwiegend spezifisch	HS	10x C↓GACC 2x T↓GACC 2x G↓GGCC
		→ CII 119	Asn	Asn	Asn	Vorwiegend spezifisch	HS	21x C↓GACC 4x A↓GACC 2x T↓GACC
		→ BI 176	Ile	Ser	Asn	Unspezifisch	LS	/
		→ CII 176	Ile	Asn	Asn	Wildtyp	LS	Siehe Ergebnis Wildtyp
		→ BI 223	Ile	Asn	Ile		Unspezifisch	
		→ CII 223						
		Doppelmutation		→ BI	Ile	Ser	Ile	Unspezifisch
→ BI	Thr			Asn	Ile	Unspezifisch	HS	/
→ BI	Thr			Ser	Asn	Unspezifisch	LS	/
Tripelmutation		→ BI	Thr	Ser	Ile	Spezifisch	LS	13x G↓AACC
24bp Deletion (vgl 4.4.2)	R.HgiBI		Thr	Ser	Ile	Unspezifisch	LS HS	/ /
			Thr	Asn	Ile	Unspezifisch	LS HS	/ /

## 4.6 Überexpression der verkürzten Methyltransferase

In Abschnitt 4.2.1 wurde spekuliert, dass auch eine verkürzte Methyltransferase *M.HgiBI* in der Lage ist, die Sequenz GGWCC zu methylieren. Um diesem Phänomen nachzugehen, wurde zunächst der Aufbau des Plasmids pKF30H genauer betrachtet (vgl. Abbildung 45). Dabei stellte sich heraus, dass neben dem N-terminalen Anteil der Methyltransferase auch der C-terminale Teil alle Merkmale eines exprimierbaren Leserahmens zeigt.



**Abbildung 45: Plasmidkarte des Vektors pKF30H.** In diesem Vektor sind weitere *AvaII* und *Sau96A*-Schnittstellen vorhanden, aber sie wurden der Übersicht halber ausgelassen.

Die N-terminale Teilsequenz startet als Direkt-Start-Anhang und endet nach Aminosäureposition 200 (vgl. Abbildung 10). Nach einer weiteren Aminosäure ist bereits der artifizielle C-Terminus erreicht (vgl. Abbildung 19).

Der C-terminale Teil der Methyltransferase beginnt frühestens mit dem Valin 216 oder mit einem Methionin in der Aminosäureposition 260. Bei oberflächlicher Betrachtung kommen beide als Start nicht in Frage, weil sich vor den entsprechenden Codons keine Shine-Dalgarno-Sequenz finden lässt. Betrachtet man jedoch die beiden anderen Leserahmen so findet sich 32 Aminosäuren vor dem Methionin 260 ein weiteres Methionin, dessen Codon von einer perfekten Shine-Dalgarno Sequenz begleitet wird. Der folgende offene Leserahmen endet überlappend mit dem Methionin 260 der Methyltransferase in einem sog. ATGA-Modul. Für dieses Modul wurde bereits mehrfach

berichtet, dass es auch dann als Start dient, wenn die begleitende Shine-Dalgarno Sequenz nicht der kanonischen Sequenz entspricht (KRÖGER und HOBOM, 1982; KARCH *et al.*, 1999, vgl. Tabelle 17). Das macht die Rolle dieses bisher nicht beachteten kleinen Leserahmens als eine Art technischer Starthilfe sehr wahrscheinlich. Deshalb wurde der jetzt orf32 benannte kleine Leserahmen (für 32 Aminosäuren Länge) in die Plasmidkarte von pKF30H aufgenommen (vgl. Abbildung 45).

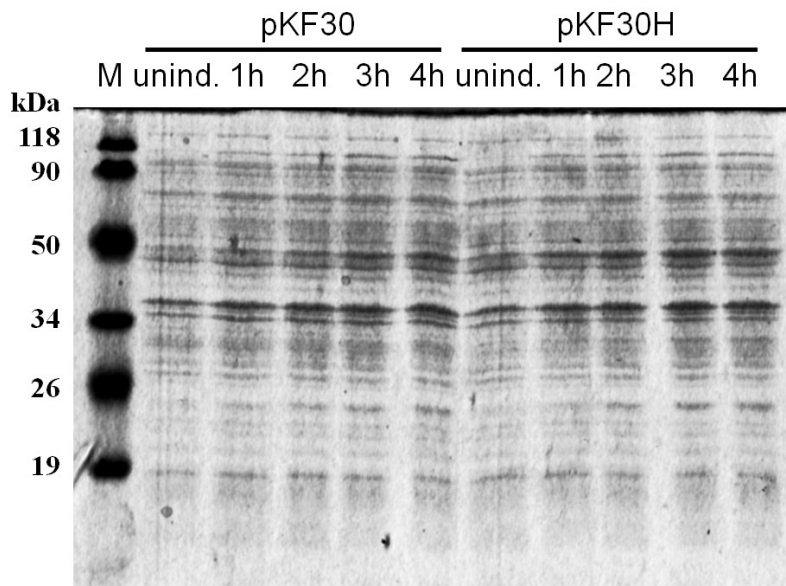
Aus der Literatur ist die Existenz zweigeteilter Methyltransferasen bekannt. Im Fall der *M.AquI* wird das sogar als Wildtypsituation beschrieben (KARREMAN und DE WAARD, 1990, PINARBASI *et al.* 2003). In allen anderen Fällen handelt es sich um künstlich hergestellte Enzyme (*BsuI* und *BspI*; PÓSFAL *et al.*, 1991).

Der Aufbau der C5-Methyltransferasen in sog. Blöcken erlaubt offenbar eine ungewöhnliche Variabilität dieser Enzymklasse. Das schließt das Vorhandensein mehrerer *target recognition domains* (TRD) zu multispezifischen Enzymen (TRAUTNER *et al.*, 1996, WALTER *et al.* 1992) genauso ein wie die separate Expression von Blöcken. Offenbar gehören die Blöcke I bis VIII zu einer Einheit, von der die Blöcke IX und X getrennt sein können (vgl. Abbildung 10). Die dazwischen liegende TRD kann dabei zur ersten oder zur zweiten Untereinheit gehören.

In dem hier vorliegenden Fall kann man sogar eine Dreiteilung postulieren. Teile der TRD gehören zu den Blöcken I bis VIII, andere Teile zu den Blöcken IX und X. Ein dritter Bereich, der die Aminosäuren 201 bis 259 umfasst, wird deletiert. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Spezifität der Methyltransferase aus pKF30H, so fällt auf, dass die *AvaII* Erkennungsstelle GGWCC nach wie vor methyliert wird (vgl. Tabelle 23). Die Nebenaktivität zur GGSCC Erkennung ist aber verloren gegangen. Man kann also postulieren, dass die Erkennung der GGSCC Sequenz in dem Bereich 201 bis 259 lokalisiert ist. Der Beweis dieser Hypothese muss im Rahmen einer weiterführenden Arbeit erbracht werden.

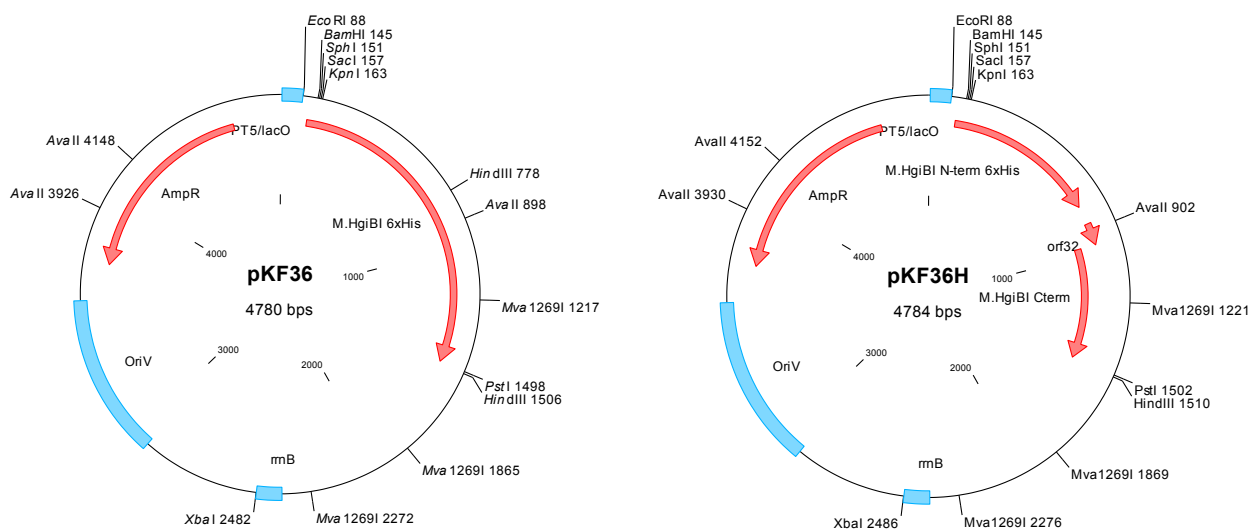
Eine denkbare Alternative zur Bildung von zwei künstlichen Untereinheiten ist das Auftreten eines Frameshifts an der Stelle des neuen STOPP-Codons 202 (vgl. Abbildung 19). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde versucht, die Methyltransferase aus pKF30H überzuexprimieren. Zunächst wurde, wie in Abschnitt 3.7.1 dargestellt, die Methyltransferase in kleinem Maßstab für vier Stunden bei 37°C überexprimiert. Parallel dazu wurde die (quasi) wildtypische Methyltransferase *M.HgiBI* aus pKF30 bei denselben Bedingungen überexprimiert. Es wurden jeweils zu den Zeitpunkten uninduziert, 1h, 2h, 3h und 4h Induktion Proben entnommen, diese in SDS-Probenpuffer aufgekocht und dann entsprechend der OD<sub>600</sub> zu den jeweiligen Zeitpunkten (d.h. vom Zeitpunkt 4h nach Induktion proportional weniger Material, aber trotzdem gleich viele Zellen wie ohne Induktion) auf ein SDS-Gel geladen. Das Ergebnis dieser Expression ist in Abbildung 46 dargestellt. Das entsprechende Polyacrylamid-Gel lässt so gut wie

keinen Unterschied zwischen uninduzierten und induzierten Proben zu erkennen. Außerdem gibt es zwischen den beiden Vektoren keinen Unterschied.



**Abbildung 46: Ergebnis der Expression der Methyltransferasen aus pKF30 und pKF30H.** unind.= uninduzierte Probe, M= Proteinmarker von Fermentas, 1h, 2h, 3h, 4h= Proben 1h, 2h, 3h, und 4h nach Induktion mit IPTG.

Aus diesem Grunde wurden beide Methyltransferase-Varianten von *M.HgiBI* in den Vektor pQE30 umkloniert. Dieser Vektor erlaubt die Konstruktion eines einen N-terminalen His-Tag. So kann man sowohl bei der (quasi) wildtypischen Version von *M.HgiBI* als auch bei der entsprechenden *HindIII*-Variante die Größe des gebildeten Proteins bestimmen. Die Umklonierung wurde durch die Kombination der kleinen Fragmente aus den mit *KpnI* und *PstI* geschnittenen Vektoren pKF30 und pKF30H mit dem *KpnI* und *PstI* geschnittenen pQE30 –Vektor erreicht. Das Ergebnis dieser Ligation heißt entweder pKF36 (beim Ursprungsvektor pKF30) bzw. pKF36H (beim Ursprungsvektor pKF30H) und ist in Abbildung 47 dargestellt.



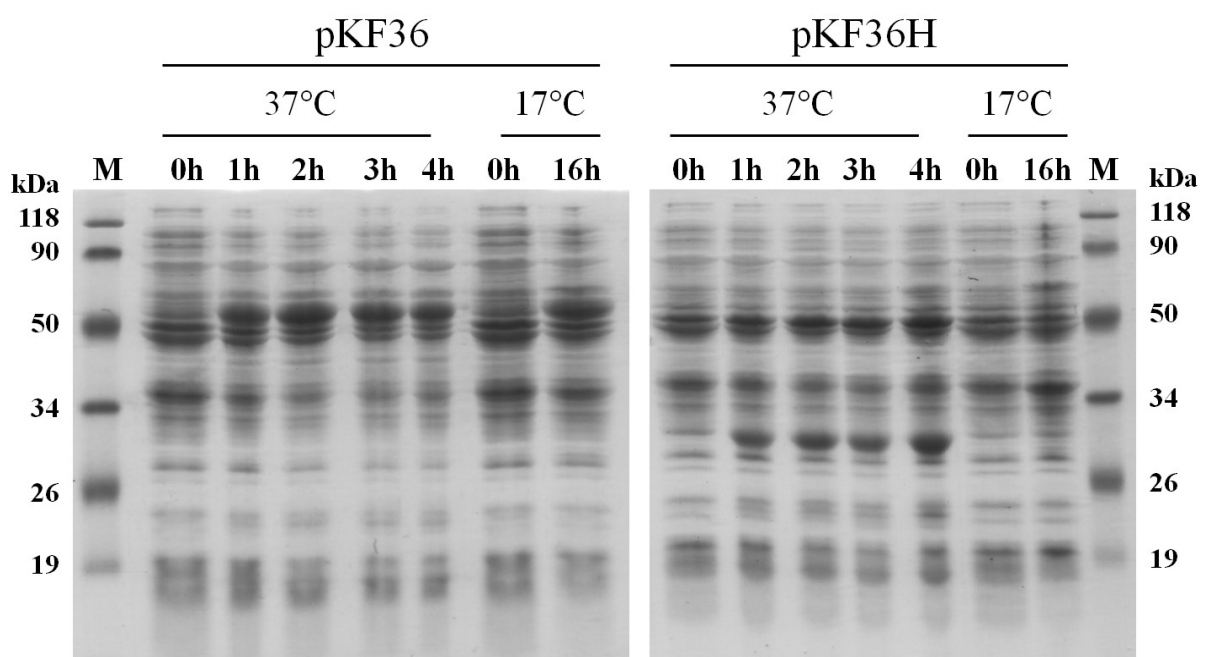
**Abbildung 47: Karten der Plasmide pKF36 und pKF36H.**



Die Transformation von pKF36 in SURE<sup>®</sup> war nicht erfolgreich, aber im Stamm XL1-blue-MRF<sup>+</sup>. Die Transformation von pKF36H wurde nach Misserfolg in BL21 (Expression nicht deutlich zu erkennen) ebenfalls mit XL1-blue-MRF<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt.

Eine Testexpression für vier Stunden bei 37°C zeigte bei pKF36 deutliche Banden der erwarteten Größe von ca. 52kDa (vgl. Abbildung 48). Bei pKF36H war eine Bande von ca. 30kDa nach Expression stärker ausgeprägt. Die nachfolgende His-Tag-Aufreinigung führte aber weder bei pKF36 noch bei pKF36H zu einem Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

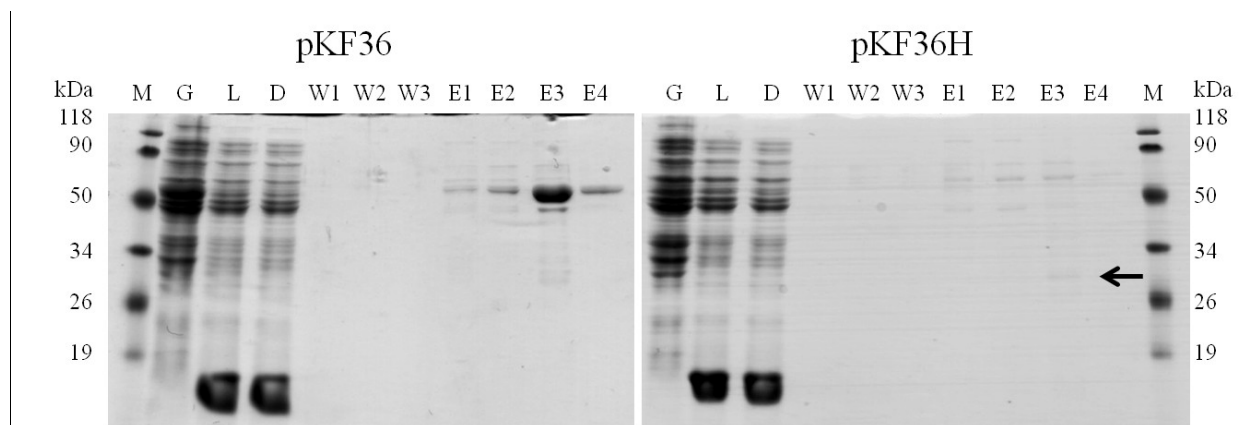
Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die für die Zelle toxischen Methyltransferasen von *E.coli* in sog. *inclusion bodies* eingelagert werden. Dadurch wird das Protein unlöslich. Da in dieser Arbeit lediglich die löslichen Proteine über die His-Tag-Aufreinigung analysiert wurden, konnten keinerlei Proteine nachgewiesen werden. Daher wurde nach Rücksprache mit S. FRÜHWIRTH aus unserem Institut eine andere Strategie für die Expression der Methyltransferase ausgewählt. In vielen Fällen ist nämlich die Expression von für die Wirtszellen schädlichen Enzymen dann möglich, wenn die Expression bei geringerer Temperatur, aber für einen längeren Zeitraum durchgeführt wird. Diese Strategie wurde hier ausgewählt. Die Zellen wurden zunächst bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 wachsen lassen, auf Eis abgekühlt und nach Induktion mit 1mM IPTG für 16h bei 17°C induziert. Proben für die SDS-PAGE wurden jeweils vor der Induktion und 16h nach der Induktion entnommen. Von diesen Proben wurde ein SDS-PAGE-Gel gefahren. Auf diesem Gel (vgl. Abbildung 48) wurden parallel die vierstündige Expression bei 37°C und die 16-stündigen Expression bei 17°C aufgetragen.



**Abbildung 48: SDS-PAGE der Expression der MTase in pKF36 und pKF36H.** Es wurden zwei verschiedene Expressionen durchgeführt, eine bei 37°C für vier Stunden, eine bei 17°C für 16 Stunden. Abkürzungen: M= Marker. Das Volumen der aufgetragenen Proben wurde an die OD<sub>600</sub> angepasst. Die Induktion wurde mit 1mM IPTG durchgeführt.

Wie man in Abbildung 48 deutlich erkennen kann, ist bei pKF36 eine ca. 60kDa große Bande eindeutig überexprimiert. Die Methyltransferase mit His-Tag hat ein ungefähres Molekulargewicht von 52kDa, d.h. dass diese Bande der überexprimierten Methyltransferase entspricht. Bei pKF36H ist nach vier Stunden eine überexprimierte Bande bei ca. 27kDa zu finden. Sie findet sich bei der 16-stündigen Expression allerdings nicht mehr.

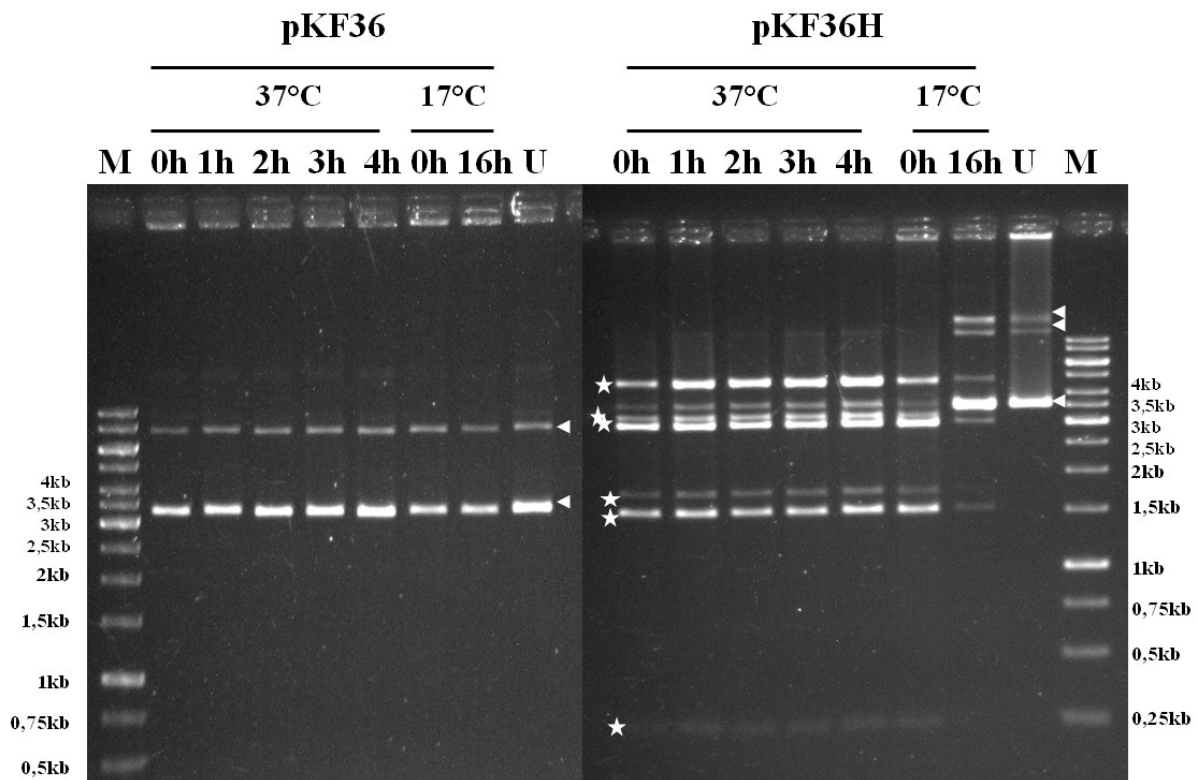
Die Proben der 16-stündigen Expression bei 17°C wurden daraufhin über His-Tag-Säulchen aufgereinigt. Hierbei zeigte es sich, dass nur die Proben von pKF36 sehr gut aufgereinigt werden konnten. Bei pKF36H ergab sich nur eine ca. 27kDa große, schwache Bande (vgl. Abbildung 49). Erwartet wurde hier eine 30kDa-Bande.



**Abbildung 49: His-Tag-Aufreinigung der 16-stündigen Expression von pKF36 und pKF36H.** Abkürzungen: G= Gesamt, L= Lysat, D= Durchfluss, W1= Wasch 1, W2= Wasch 2, W3= Wasch 3, E1-1= Eluat E1-1, E1-2= Eluat E1-2, E2-1= Eluat E2-1, E2-2= Eluat E2-2, M= Marker. Markiert ist die schwache Bande bei pKF36H.

Da die Menge an Enzym bei pKF36H für einen in vitro-Test nicht ausreichte, wurde die Aktivität der Methyltransferase mittels eines *AvaII*-Verdaues überprüft. Während für pKF36 ein aktives Enzym erwartet wurde, sollte bei pKF36H nur ein inaktives Protein gebildet werden, weil die Domäne für die Bindung des Cofaktors (S-Adenosyl-L-Methionin, SAM) fehlt.

Das Ergebnis des entsprechenden Verdaues ist in Abbildung 50 dargestellt. Tabelle 48 stellt die zu erwartenden Bandengrößen dar, die bei vollständig ungeschütztem pKF36 und pKF36H entstehen würden.



**Abbildung 50: Verdau von pKF36 und pKF36H mit *AvaII* nach Induktion mit IPTG bei 37°C für vier Stunden bzw. bei 17°C für 16 Stunden.** Mit weißen Pfeilen markiert sind Banden, welche bei einem kompletten Schutz der Plasmide vor *AvaII* zu finden sind. Weiße Sterne markieren Banden, die entweder teilweise oder komplett verdaute Plasmide darstellen. M= Marker, 1kb ladder von Fermentas, U= unverdaute Probe.

**Tabelle 48: Bandengrößen von mit *AvaII* verdaulichem pKF36 und pKF36H.** In Klammern angegeben ist die Gesamtgröße der einzelnen Plasmide.

pKF36 (4780bp)	pKF36H (4784bp)
3028bp	3028bp
1530bp	1534bp
222bp	222bp

Wie in Abbildung 50 zu beobachten, zeigt pKF36 tatsächlich einen kompletten Schutz gegen *AvaII*, auch wenn die Zellen nicht induziert wurden. Hier zeigt sich, dass bereits eine geringe Konzentration der Methyltransferase *M.HgiBI* ausreicht, um die DNA der Zelle und somit auch die dort befindlichen Plasmide zu methylieren. Bei pKF36H werden dagegen zahlreiche Fragmente beobachtet. Hier findet man bei fast allen Proben einen weitaus geringeren Schutz gegen den *AvaII*-Verdau als bei pKF36. Nur wenn die Proben bei 17°C für 16 Stunden induziert wurden, findet man ein annähernd ähnliches Bild wie bei pKF36. Hier ist nur sehr wenig DNA ungeschützt und das Plasmid somit fast gar nicht verdaut. Die einzige Veränderung zu der Induktion bei 37°C für vier Stunden ist die Anzahl der löslichen Proteine in der Zelle, wie man an der Expression von *M.HgiBI* aus pKF36 sehen konnte. Dies ist daran zu erkennen, dass die

Aufreinigung bei der vierstündigen Expression im Gegensatz zu der 16-stündigen Expression zu einer weitaus höheren Ausbeute an Enzymen geführt hat. Bei pKF36H sollte dies ebenso sein. Also ist auch hier die Expression erfolgreich gewesen, obwohl sie auf dem SDS-Gel nicht so eindeutig zu beobachten gewesen ist. Dieses Ergebnis bestätigt die grundlegende Beobachtung, zeigt aber, dass falsche Induktionsbedingungen leicht zu Fehlinterpretation führen können.

## 5 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, nachzuvollziehen, wie es in der Natur zur Herstellung von RM-Systemen mit neuer Spezifität (oder Aktivität) kommen kann, wenn zwei interagierende Proteine quasi gleichzeitig geändert werden müssen. Dies wurde an den verwandten Systemen RM.*Hgi*BI, RM.*Hgi*CII und RM.*Hgi*EI untersucht. Die Unterschiede in der Klonierung dieser Systeme (vgl. Abschnitt 1.7) dienen hierbei als Grundlage für diese Untersuchung. Bei RM.*Hgi*BI und RM.*Hgi*EI lagen bereits zahlreiche Mutanten der Endonuklease vor. Eine dieser Varianten (R.*Hgi*BI S176N) konnte in Kombination mit M.*Hgi*BI nicht kloniert werden. Die Abweichung an Aminosäure-Position 176 mit und ohne Kombination der Aminosäure in Position 223 wurde deshalb von BLUM (1995) als die Position angesehen, welche bei der schwierigen Klonierung von RM.*Hgi*CII und RM.*Hgi*EI eine wesentliche Rolle spielt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Mutante R.*Hgi*BI S176N herzustellen. Dies stellte sich aufgrund von zahlreichen Misserfolgen (BLUM, 1995, KRIESE, 1996, Kriese, unpubl.) als intellektuelle Herausforderung dar. Es galt, die Ursache der Nichtklonierbarkeit der Variante R.*Hgi*BI S176N aufzuklären. Hierbei sind die folgenden drei Ursachen möglich:

1. Die Endonuklease R.*Hgi*BI S176N ist aktiver als R.*Hgi*BI. Die Methyltransferase M.*Hgi*BI ist weniger aktiv, und schafft es deshalb nicht, die DNA des Wirtes und der Plasmide rechtzeitig zu methylieren.
2. Die Endonuklease R.*Hgi*BI S176N besitzt eine zusätzliche Spezifität. M.*Hgi*BI besitzt diese nicht. Die Kontrolle durch M.*Hgi*BI ist daher nicht möglich.
3. Der kleine Leserahmen C.*Hgi*BI spielt zwar keine Rolle für die Klonierung von R.*Hgi*BI, wird aber für die Etablierung von R.*Hgi*BI S176N benötigt.

Diese drei Hypothesen galt es in dieser Arbeit zu prüfen. Im ersten Schritt sollte versucht werden, R.*Hgi*BI S176N ohne Einfluss des kleinen Leserahmens C.*Hgi*BI zu klonieren, da die Funktion dieses Leserahmens jahrelang ungeklärt ist. Im zweiten Schritt sollte R.*Hgi*BI S176N unter Einfluss des kleinen Leserahmens kloniert werden. Es wurde vermutet, dass entgegen früheren Versuchen die Klonierung von R.*Hgi*BI S176N mit C.*Hgi*BI ohne Probleme möglich sein sollte.

## 5.1 Erste Herstellung der Mutante R.*Hgi*BI S176N

Im ersten Schritt wurde ermittelt, ob sich die früher erhaltenen Ergebnisse bei der Klonierung von R.*Hgi*BI S176N mit den heutigen Methoden reproduzieren ließen. BLUM (1995) und KRIESE (1996, unpubl.) versuchten die Mutante durch eine Umsetzen nach Restriktionsverdau aus einer Kombination von R.*Hgi*EI und R.*Hgi*BI zu erhalten. Es war zu vermuten, dass eine *site directed mutagenesis* über inverse PCR die Klonierung der Mutante ermöglichen würde. Tatsächlich zeigte es sich, dass die Mutante R.*Hgi*BI S176N über inverse PCR erhalten werden konnte (vgl. Abschnitt 4.3). Nach einer genaueren Untersuchung des erhaltenen Klons zeigte es sich allerdings, dass die Mutagenese nur aufgrund einer Kombination von Ereignissen erfolgreich gewesen war. Dieselbe Mutagenese, mit der R.*Hgi*BI S176N hergestellt worden war, führte nämlich zur Deletion einer Base innerhalb der Methyltransferase M.*Hgi*BI, welche auf dem gleichen Plasmid wie R.*Hgi*BI S176N kodiert war. Die Zellen überlebten, brauchten also eine Methylierung von anderer Stelle. Es stellte sich heraus, dass das Überleben dieser Mutante durch das ständige Vorhandensein des Vormethylierungsplasmids pHK662, welches die Methyltransferase M.*Hgi*CII kodiert, gewährleistet war. Ganz offensichtlich reicht die Aktivität der homologen Methyltransferase M.*Hgi*BI nicht aus, um die S176N-Mutante zu kontrollieren. Im Gegensatz dazu muss man aufgrund des vollständigen Schutzes durch M.*Hgi*CII davon ausgehen, dass diese Methyltransferase um so viel aktiver ist, dass sie die Kontrollfunktion bzw. Schutzfunktion erfüllen kann. Aufgrund der Konstruktion kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass die Anwesenheit des Kontroll-Leserahmens OrfC (vgl. 1.7) dazu führt, dass die Expression der Methyltransferase deutlich besser ist und somit ein kinetischer Effekt für die Klonierbarkeit verantwortlich ist.

An dieser Stelle ist zunächst wichtig, dass die Mutante R.*Hgi*BI S176N hier erstmals erfolgreich hergestellt werden konnte. Diese Tatsache muss hinsichtlich der zahlreichen früheren Misserfolge (BLUM, 1995, KRIESE, 1996 und unpubl.) als erheblicher Erfolg angesehen werden.

Zur Erklärung dieses Phänomens wurde zwei der oben genannten Hypothesen aufgestellt: Entweder ist die Aktivität von R.*Hgi*BI S176N im Vergleich zu R.*Hgi*BI S176N erhöht (dies würde eine stärkere Aktivität der Methyltransferase M.*Hgi*CII im Vergleich zu M.*Hgi*BI beinhalten) oder R.*Hgi*BI S176N besitzt eine zusätzliche Spezifität, die nur von M.*Hgi*CII abgedeckt wird. Die zuletzt genannte Hypothese würde bedeuten, dass M.*Hgi*CII eine zusätzliche Spezifität im Vergleich zu M.*Hgi*BI besitzt. Es galt nun, die Aktivität und Spezifität von Restriktionsenzymen und Methyltransferasen zu überprüfen. Dies war nun auch für die Mutante R.*Hgi*BI S176N möglich. Zum anderen wusste man nun, dass diese Mutante prinzipiell

herzustellen ist, so dass man nun auch die hierzu benötigten Bedingungen systematisch untersuchen konnte.

## 5.2 Zusätzliche Spezifitäten von Methyltransferasen und Endonukleasen

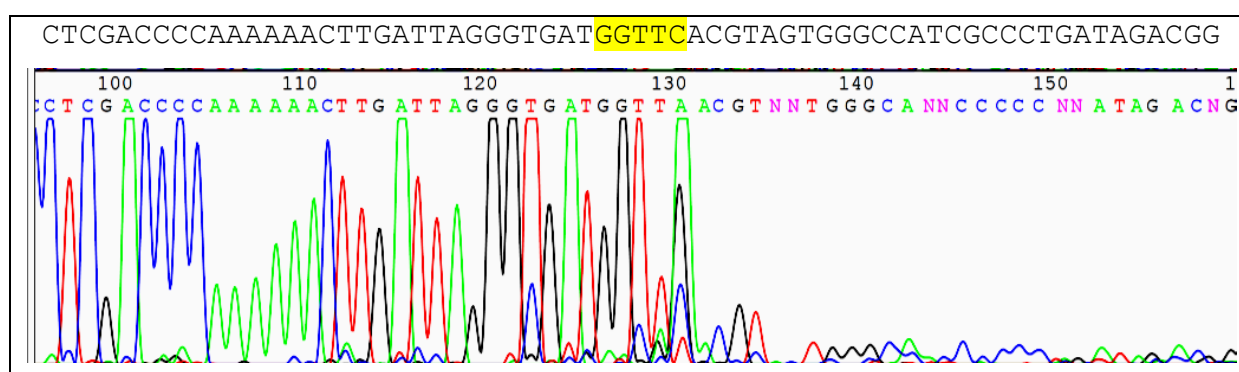
Um die Klonierung von *R.HgiBI* S176N in Kombination mit *M.HgiCII* zu erklären, wurden zunächst die Methyltransferasen (vgl. Abschnitt 4.2) und Restriktionsenzyme (vgl. Abschnitt 4.5.2) der Systeme *RM.HgiBI*, *RM.HgiEI* und *RM.HgiCII* auf ihre Aktivität und Spezifität hin überprüft.

Die Nebenaktivität der Methyltransferasen wurde über Bisulfit-Sequenzierung (vgl. 3.6) ermittelt. Die wildtypischen Methyltransferasen zeigten entgegen den Ergebnissen aus der eigenen Diplomarbeit eine Stafflung in der Aktivität an der wildtypischen Sequenz GGWCC, wie sie analog von BLUM (1995) bei den Endonukleasen *R.HgiBI*, *R.HgiCII* und *R.HgiEI* beobachtet worden ist (vgl. Abbildung 9). *M.HgiCII* ist in tatsächlich in der Lage, die Sequenz GGWCC stärker als *M.HgiEI* zu methylieren, die Methyltransferase *M.HgiBI* methyliert diese Sequenz am schwächsten (vgl. Tabelle 23). Bei *M.HgiCII* wurde keine weitere Spezifität beobachtet. *M.HgiEI* und *M.HgiBI* zeigten dagegen, wie bereits in der eigenen Diplomarbeit beobachtet, eine Methylierung der Sequenz GGSCC (vgl. Tabelle 23).

Auf Endonuklease-Ebene wurde die spezifische Aktivität von *R.HgiEI*, *R.HgiBI* und *R.HgiCII* nicht überprüft, weil dies bereits an anderer Stelle (BLUM 1995, vgl. Abbildung 9) geschehen ist. Die spezifische Aktivität der Mutante *R.HgiBI* S176N wurde erst jetzt möglich. Sie sollte aber laut BLUM deutlich aktiver als *R.HgiBI* sein. In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob die Endonukleasen eine zusätzliche Spezifität aufweisen. Eine zusätzliche Spezifität bei *R.HgiBI* S176N könnte auch ein Grund für die Nicht-Klonierbarkeit dieser Mutante sein. Der Grund für die Bestimmung von zusätzlichen Spezifitäten der Endonukleasen *R.HgiBI*, *R.HgiCII* und *R.HgiEI* lag darin, dass KRIESE bei *R.HgiBI*, *R.HgiEI* und deren Mutanten eine Nebenaktivität beobachten konnte (siehe unten). Für die Bestimmung der Nebenaktivität wurden die in Tabelle 45 dargestellten Endonuklease-Varianten über His-Tag-Label (vgl. 3.7.2) aufgereinigt, und für die Bestimmung von zusätzlichen Nebenaktivitäten verwendet. Die Mutante *R.HgiBI* S176N konnte hier zu ersten Mal aufgereinigt werden.

Mit der in Abbildung 41 dargestellten, neu entwickelten Methode wurde nach zusätzlichen Spezifitäten der Endonukleasen gesucht. Es stellte sich heraus, dass einige der untersuchten Endonukleasen zusätzliche Spezifitäten aufweisen. Sie konnte bei *R.HgiEI* WT (Hochsalzpuffer, YGACC), deren Mutanten *R.HgiEI* I119T und *R.HgiEI* 119N (Hochsalzpuffer, TGACC). Das Ergebnis der Nebenaktivitätsbestimmung für *R.HgiBI* ist Abbildung 42 dargestellt. Aus den dort

gezeigten eindeutigen Daten kann geschlossen werden, dass *R.HgiBI* als Nebenaktivität die Sequenz GAACC erkennt und schneidet. Die zu *R.HgiBI* analoge Mutante *R.HgiEI* I119T N176S N223I (sequenzidentisch zu *R.HgiBI*) zeigt ebenfalls die Nebenaktivität GAACC. Jens KRIESE hatte diese Sequenz ebenfalls erhalten. Die korrekte Interpretation seiner Daten scheiterte aber an der Eigenschaft der Taq-Polymerase, ein zusätzliches Desoxy-Adenosin anzuhängen, und danach weitere Nukleotide unspezifisch zu addieren. Aus heutiger Sicht lässt sich die Erkennungssequenz für die gesuchte Nebenaktivität aus den Daten von KRIESE auslesen (vgl. Abbildung 51). Die hier entwickelte Methode liefert sehr zuverlässig eindeutige Daten.



**Abbildung 51: Ermittlung der Nebenaktivität von *R.HgiBI* durch Jens Kriese.** Sie wurde aufgrund des an Position 130 eingefügten Desoxy-Adenosins falsch interpretiert. Darüber eingefügt ist die Original-Sequenz aus pBSSK+, gelb markiert die in dieser Arbeit ermittelte Nebenaktivität (GGTTC oder GAACC).

Der Vergleich der Nebenaktivitäten von *R.HgiBI* und *M.HgiBI* zeigte, dass sich die bei *R.HgiBI* beobachtete Nebenaktivität GAACC zunächst nicht in der Aktivität der Methyltransferase widerspiegelte. Dies führt zu der Annahme, dass die Sequenz GAACC lediglich eine Star-Aktivität der Endonuklease unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist. Dies konnte aber durch einen weiteren Versuch widerlegt werden. Bei der Entwicklung der Klone für die Bestimmung der Nebenaktivität konnte ein Deletionsklon von *M.HgiBI* erhalten werden, der diese Aktivität zeigt (vgl. Tabelle 23, im Abschnitt 5.6 weiter erwähnt). Dieser Klon zeigt GGWCC-Aktivität, aber keine GGSCC-Aktivität mehr. Das bedeutet, dass *M.HgiBI* auch die Sequenz GAACC methyliert. Dieses Ergebnis wird aber bei der Wildtyp-Methyltransferase *M.HgiBI* nicht beobachtet, weil sie von der stärkeren GGSCC-Aktivität überdeckt wird. Aufgrund dieses Versuches kann man sagen, dass es sich bei der Sequenz GAACC um eine spezifische Nebenaktivität von *R.HgiBI* handelt. Die Funktion der GGSCC-Methylierung durch *M.HgiBI* ist nicht geklärt, weil die Endonuklease *R.HgiBI* bei den untersuchten Bedingungen keine GGSCC-Aktivität aufweist.



Die Hypothese, dass R.*Hgi*BI S176N aufgrund einer hinzugekommenen zusätzlichen Spezifität nicht klonierbar ist, ist aufgrund der erhaltenen Ergebnisse hinfällig. Vielmehr wird durch Einfügen der Mutation S176N die Fähigkeit der Endonuklease, die Sequenz GAACC zu schneiden, zerstört. Es ist aber nicht anzunehmen, dass die Endonuklease R.*Hgi*BI S176N nur deshalb schwieriger ist, weil sie die Nebenaktivität des Wildtyps nicht besitzt. Das wäre unlogisch. Als Grund für die Nicht-Klonierbarkeit von R.*Hgi*BI S176N muss daher die zu geringe Aktivität der Methyltransferase M.*Hgi*BI (vgl. Tabelle 23) angesehen werden. Im nächsten Schritt sollte deshalb getestet werden, ob R.*Hgi*BI S176N mit M.*Hgi*BI kombiniert werden kann, wenn diese stärker exprimiert wird.

### 5.3 Einfluss von M.*Hgi*BI Varianten und Mutanten auf die Translation

In einer Serie von Versuchen wurde versucht, ob die Änderung der Expressionsrate der wildtypischen Methyltransferase M.*Hgi*BI die Kombination mit R.*Hgi*BI S176N ermöglicht. Klar ist, dass M.*Hgi*BI als LacZ<sub>α</sub>-Fusion nicht mit R.*Hgi*BI S176N zu kombinieren ist (vgl. 4.3). Dies könnte mehrere Gründe haben. Entweder ist M.*Hgi*BI generell zu schwach, um die Zellen vor R.*Hgi*BI S176N zu schützen, oder sie ist in der LacZ<sub>α</sub>-Fusion weniger aktiv.

Daher wurde versucht, M.*Hgi*BI in den folgenden zwei Expressionsvarianten mit R.*Hgi*BI S176N zu kombinieren.

1. ATGA-Übergang von M.*Hgi*BI (pBI-His ATGA, vgl. Abbildung 55)
2. Direkt-Stopp-Konstrukt von M.*Hgi*BI (pBI-His Dir, Abbildung 56)

Bei dem ATGA-Übergang handelt es sich um eine künstliche Nachahmung der durch KRÖGER und HOBOM (1982) beschriebenen Situation der *ninR*-Genregion im Phagen  $\lambda$ . Hierbei überlappen TGA-Stoppcodon mit dem ATG des folgenden Gens, so dass ein sogenanntes ATGA-Modul entsteht. Das zweite Gen dieses Moduls wird in der Regel genauso stark abgelesen, wie das erste (KRÖGER unpubl.). Somit wird im Falle eines ATGA-Moduls aus LacZ<sub>α</sub>-Fragment und Methyltransferase eine Situation geschaffen, in der die Methyltransferase mit der gleichen Effizienz wie das LacZ<sub>α</sub>-Fragment gebildet wird. Die Expression der Methyltransferase in der ATGA-Variante ist aus unbekannten Gründen höher als die der LacZ<sub>α</sub>-Fusion von M.*Hgi*BI. Dies konnte durch Restriktionsverdau und Bisulfit-Reaktion gezeigt werden. Der Vorteil dieser Variante liegt also in der höheren Expressionsrate und in dem Fehlen des möglicherweise störenden Fremdproteinanteils. Die Klonierung der ATGA-Konstrukte, die nun nur noch die wildtypische Methyltransferase M.*Hgi*BI kodieren, wurde mit großer Vorsicht durchgeführt, weil

es sich gezeigt hatte, dass sich deren Klonierung in SURE<sup>®</sup> und HB101 als schwierig gestaltet (vgl. Abschnitt 4.1.1). Es gelang aber in BL21-Zellen. Darauf soll an anderer Stelle eingegangen werden (vgl. Abschnitt 5.7).

Bei dem in der eigenen Diplomarbeit entwickelten Direkt-Stopp-Konstrukt endet das LacZ<sub>α</sub>-Fragment genau 4 2/3 Codons vor dem Start der Methyltransferase. In dem Zwischenbereich liegt die natürliche Shine-Dalgarno-Sequenz der Methyltransferase. Aufgrund fehlender Überlappung sollte sie unabhängig von LacZ<sub>α</sub> exprimiert werden. Die Expressionsrate eines Direkt-Stopp-Konstruktes von *M.HgiBI* (pBIM-5, vgl. Abbildung 18) wurde mit der Expressionsrate von *M.HgiBI* in pBI-His verglichen (LacZ<sub>α</sub>-Fusion von *M.HgiBI*). Diese Raten erwiesen sich als sehr ähnlich, aber auch als weitaus geringer als die der ATGA-Konstruktion. Dieser Vergleich zeigt erneut, dass die besonders starke Expression des LacZ<sub>α</sub>-Proteins über das ATGA-Modul erhalten bleibt. Diese effektive Weitergabe der Expressionsrate erlaubt also prinzipiell diese besonders hohe Rate auf beliebige wildtypische Proteine zu übertragen. Diese sollte von hoher genereller Bedeutung sein, wenn es gilt, die Expression wirtschaftlich interessanter Proteine zu optimieren. An dieser Stelle muss vermutet werden, dass der Komplex aus mRNA und Ribosomen entgegen der herrschenden Lehrmeinung am STOPP nicht vollständig dissoziiert. Hier muss also ein neuer Zwischenkomplex formuliert werden, der die Bindung des Terminationsfaktors und die quasi gleichzeitige Bindung des Initiationsfaktors so berücksichtigt, dass dasselbe Ribosom die Translation fortsetzt. Modelle dazu werden derzeit in der Arbeitsgruppe Kröger formuliert (GÖKYILDIRIM 2011).

In allen zwei Fällen (ATGA-Übergang, Direkt-Stopp) liegt die Methyltransferase möglicherweise ohne störenden LacZ<sub>α</sub>-Anteil vor. Trotz der hohen Expressionsrate von *M.HgiBI* bei dem ATGA-Übergang war keine Kombination dieser Variante mit *R.HgiBI* S176N möglich. Es war daher nicht mehr überraschend, dass eine Kombination des Direkt-Stopp-Konstrukts von *M.HgiBI* mit *R.HgiBI* S176N nicht möglich war, wenn deren Expressionsrate so sehr von der ATGA-Variante abwich.

Weiterhin wurde bei der Direkt-Stopp-Anbindung von *M.HgiBI* überprüft, ob eine Vormethylierung mit *M.HgiBI* (pKF26) statt mit *M.HgiCII* die Klonierung ermöglichen würde. Auch dieses gelang nicht.

Aus diesem negativen Ergebnis muss endgültig geschlossen werden, dass *M.HgiBI* in den verwendeten Expressionsvarianten nicht in der Lage ist, die Zellen vor *R.HgiBI* S176N zu schützen. Der Grund dafür muss die Stärke der Methyltransferase sein, da *R.HgiBI* S176N im Vergleich zu *R.HgiBI* keine zusätzliche Nebenaktivität besitzt. Als Konsequenz daraus wurde versucht, eine aktivere Mutante von *M.HgiBI* mit *R.HgiBI* S176N zu kombinieren.

Die Mutante *M.HgiBI* A289V G290D hat im Vergleich zu *M.HgiBI* eine um ca. 1/3 erhöhte Aktivität an den beiden Sequenzen GGWCC und GGSCC. Die Mutation an Position 289 und 290 erhöht daher die Aktivität der Methyltransferase an den Sequenzen GGWCC und GGSCC, ohne dass das Verhältnis zwischen den beiden verändert wird. Diese Mutation wurde in zwei verschiedenen Translationsvarianten mit *R.HgiBI* S176N kombiniert.

Es zeigte sich, dass *M.HgiBI* A289V G290D als Direkt-Stopp-Konstrukt mit *R.HgiBI* S176N kombiniert werden kann, als *LacZ<sub>α</sub>*-Fusion hingegen nicht. Dies bestätigt eindrucksvoll den aktivitätsmindernden Einfluss des N-terminalen *LacZ<sub>α</sub>*-Anteils.

Besondere Bedeutung kommt der Beobachtung zu, dass der resultierende Stamm *M.HgiBI* A289V G290D immer, d.h. auch nach Überimpfen den Vektor pHK662 enthält. Es ist daher zwingend, eine Erklärung für dieses Phänomen zu finden, wenn man die gegenseitigen Einflüsse der verschiedenen Varianten verstehen will. Man muss erklären, warum es grundsätzlich möglich ist, *M.HgiBI* A289V G290D mit *R.HgiBI* S176N zu klonieren, aber dieser Klon immer noch den Schutz von *M.HgiCII* benötigt. Da bestätigt werden konnte, dass *M.HgiCII* nur die Sequenz GGWCC, aber in sehr viel stärkerem Maße als die homologen Enzyme, methyliert, muss man den Schluss ziehen, dass auch *M.HgiBI* A289V G290D die Sequenz GGWCC nicht ausreichend methyliert, wie es zum Schutz der Zellen vor *R.HgiBI* S176N notwendig ist. Die Tatsache, dass die Methyltransferase *M.HgiBI* A289V G290D in diesem Stamm nicht deletiert ist, lässt umgekehrt nicht darauf schließen, dass die dort beobachtete Nebenaktivität an der Position GGSCC für die Etablierung von *R.HgiBI* S176N benötigt wird. Hier kann man davon ausgehen, dass die zusätzliche Aktivität an der Sequenz GGSCC dem Stamm nicht schadet und deshalb dort konstruktionsbedingt mitgeschleppt wird.

## 5.4 Einfluss von *M.HgiEI* Translationsvarianten und Mutanten

Aus der Tatsache, dass sich *R.HgiBI* S176N mit der aktiveren Mutante *M.HgiBI* A289V G290D klonieren ließ, wurde geschlossen, dass die entsprechende aktivere Methyltransferase *M.HgiEI* (vgl. Tabelle 23) in der Lage sein sollte, die Zellen gleichfalls vor *R.HgiBI* S176N zu schützen. Entsprechend wurde versucht, zunächst *M.HgiEI* WT als *LacZ<sub>α</sub>*-Fusion und Direkt-Stopp-Konstrukt mit *R.HgiBI* S176N zu kombinieren (vgl. 4.4.1). Die ATGA-Übergangsvariante wurde nicht untersucht, da dies keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn versprach.

Entgegen dieser Erwartung konnte *R.HgiBI* S176N aber mit keiner der beiden Translationsvarianten von *M.HgiEI* erhalten werden, obwohl *M.HgiEI* sehr viel aktiver ist als *M.HgiBI* (vgl. Tabelle 23). Folglich wurden nun verschiedene Mutanten von *M.HgiEI* an Position 215, 289 und 290, dies sowohl als *LacZ<sub>α</sub>*-Fusion als auch als Direkt-Stopp-Konstrukt mit *R.HgiBI*

S176N kombiniert. Die Vormethylierung der Zellen mit pHK662 führte bei keinem der Konstrukte zu lebensfähigen Stämmen. Erst bei Vormethylierung der Zellen mit pKF26 (vgl. Abbildung 35) konnte mit der Tripelmutante *M.HgiEI* E215D V289A D290G eine Kombination mit *R.HgiBI* S176N erhalten werden. Diese Mutation ist an den drei Aminosäure-Positionen 215, 289 und 290 identisch zu *M.HgiBI*, weicht aber an drei weiteren davon ab.

Dieses Ergebnis ist aus zwei Gründen erstaunlich: 1. Die Tripelmutante *M.HgiEI* E215D V289A D290G zeigt in der Bisulfit-Reaktion eine geringere Aktivität als *M.HgiBI* A289V G290D. 2. Als Vormethylierungs-Vektor konnte nicht pHK662 (kodiert *M.HgiCII*) verwendet werden, sondern nur pKF26 (kodiert *M.HgiBI*) erfüllte diese Funktion. Der Vektor pKF26 wird aber im Gegensatz zu pHK662 im Stamm *M.HgiBI* A289V G290D kombiniert mit *R.HgiBI* S176N (vgl. 5.3) vermutlich nur für die grundsätzliche Vormethylierung der Zellen benötigt, weil er nach Überimpfen der Zellen nur noch in Spuren vorhanden ist. Wird hier die Ampicillin-Konzentration von üblicherweise 100µg/ml auf 300µg/ml erhöht, so verlieren diese Zellen das Plasmid pHK662. Dies ist bei der Kombination *M.HgiBI* A289V G290D mit *R.HgiBI* S176N nicht möglich. Dieser Stamm benötigt den Vektor pHK662, der trotz des vorhandenen Selektionsdrucks weiter in der Zelle verbleibt. Die Zellen wachsen folglich bei 300µg/ml Ampicillin-Konzentration nur sehr schlecht an. Die Mutante *M.HgiBI* A289V G290D benötigt also immer eine Hilfe bei der Methylierung, *M.HgiEI* E215D V289A D290G trotz schwächerer Methylierung der Sequenzen GGWCC und GGSCC nur am Anfang. Mit einer Erhöhung der Ampicillin-Konzentration von 100µg/ml auf 300µg/ml kann man also zusätzlich zu einem Verdau der Plasmide direkt ermitteln, ob die Zellen nur vormethyliert sind, oder das Vormethylierungs-Plasmid weiterhin benötigen.

Da bei *M.HgiEI* E215D V289A D290G das Plasmid pKF26 für die Vormethylierung verwendet werden muss, ist davon auszugehen, dass die bei der auf pKF26 kodierten wildtypischen *M.HgiBI* beobachtete Methylierung der Sequenz GGSCC der ausschussgebende Faktor für die Kombination dieser Mutante mit *R.HgiBI* S176N ist. Diese Tatsache würde bedeuten, dass die Endonuklease *R.HgiBI* S176N in geringem Maße auch GGSCC schneiden müsste. Dies deckt sich aber nicht mit der Tatsache, dass *R.HgiBI* S176N zunächst mit *M.HgiCII* klonierbar war. Diese Methyltransferase besitzt keine GGSCC-Aktivität. Weiterhin ungeklärt ist die Tatsache, warum eine schwächere Methylierungsaktivität von *M.HgiEI* E215D V289A D290G im Gegensatz zu der stärkeren *M.HgiBI* A289V G290D Mutante die Kombination mit *R.HgiBI* S176N ermöglicht. Die logische Erklärung dieser Tatsachen bleibt zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

## 5.5 Einfluss des kleinen Leserahmens *C.HgiEI*

Der Einfluss des kleinen Leserahmens *C.HgiEI* bzw. *C.HgiCII* auf die Klonierung der RM-Systeme *RM.HgiEI* und *RM.HgiCII* ist seit den Arbeiten zu diesen Systemen bekannt (ERDMANN 1991, BLUM 1995). *RM.HgiCII* wurde stets als das aktivste RM-System angesprochen. Es ließ sich erst dann in der natürlichen Orientierung klonieren, als *C.HgiCII* als *LacZ<sub>α</sub>*-Fusion exprimiert wurde, trotz des Fehlens von 12 Aminosäuren. Deshalb sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob *C.HgiBI* auch einen Einfluss auf die Klonierbarkeit von *R.HgiBI* S176N besitzt. Dies wurde bis *dato* nicht überprüft, da diese Mutante erst in dieser Arbeit hergestellt werden konnte.

Um den Einfluss von *C.HgiEI* auf die Klonierung von *R.HgiBI* S176N zu testen, wurden drei verschiedene Kombinationen überprüft:

1. *C.HgiBI* + *M.HgiBI* + *R.HgiBI* S176N
2. *C.HgiEI* + *M.HgiEI* + *R.HgiBI* S176N
3. *C.HgiEI* + *M.HgiEI* + *R.HgiEI* I119T N223S

Bei *R.HgiEI* I119T N223S handelt es sich um eine Mutante von *R.HgiEI*, die sequenz-identisch zu *R.HgiBI* S176N ist.

Überraschenderweise war die Klonierung in allen drei Fällen erfolgreich. Hierbei muss der guten Ordnung halber bemerkt werden, dass auch in der ersten oben genannten Kombination aus klonierungstechnischen Gründen statt *C.HgiBI* das heterologe Enzym *C.HgiEI* eingesetzt wurde. Es unterscheidet sich allerdings von *C.HgiBI* in keiner Aminosäure. Lediglich auf DNA-Ebene sind einige stille Mutationen zu finden. Bei diesen Konstrukten handelte es sich erneut um eine verkürzte Version des *OrfC* als *LacZ<sub>α</sub>-C.HgiEI*-Fusion. Sie bestand nicht wie bei BLUM (1995) aus allen 125 Aminosäuren (82 Aminosäuren *C.HgiEI*, 42 Aminosäuren *LacZ<sub>α</sub>*-Fragment), sondern lediglich aus 93 Aminosäuren (82 Aminosäuren *C.HgiEI*, 11 Aminosäuren *LacZ<sub>α</sub>*-Fragment). Wie man erkennen kann, ist lediglich der *LacZ<sub>α</sub>*-Anteil dieser Fusion verkürzt, während der *C.HgiEI*-Anteil der Fusion identisch ist. Im Falle der ersten Kombination war pHK662 ähnlich wie bei der Kombination von *M.HgiBI* A289V G290D mit *R.HgiBI* S176N in den Zellen weiterhin vorhanden. Im Falle der zweiten Kombination wurde nicht überprüft, ob pHK662 vorhanden war. Die dritte, eigentlich mit der zweiten Kombination sequenzidentische, konnte nach Kultivierung in LB-Medium mit 300µg/ml Ampicillin, wie die Kombination von *M.HgiEI* E215D V289A D290G mit *R.HgiBI* S176N, von dem Vektor pHK662 befreit werden. Aus diesem Grunde wird davon ausgegangen, dass die zweite Kombination ebenfalls kein pHK662 benötigt.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei Aussagen machen: 1. *M.HgiEI* ist in der Lage, bei Vorhandensein von *C.HgiEI* die Zellen vor *R.HgiBI* S176N zu schützen. 2. *M.HgiBI* ist in der

Kombination mit *C.HgiEI* nur dann in der Lage, die Zellen vor *R.HgiBI* S176N zu schützen, wenn das Plasmid pHK662 weiterhin in der Zelle vorhanden ist.

Dies beweist, dass *M.HgiEI* und nicht *M.HgiBI* bei Vorhandensein von *C.HgiEI* in der Lage ist, die Zellen alleine vor *R.HgiBI* S176N zu schützen. Dies muss auf die erhöhte Aktivität der Methyltransferase *M.HgiEI* zurückzuführen sein. Ob neben der Methylierung der GGWCC-Position auch die Methylierung der GGSCC-Position eine Rolle spielt, bleibt offen und muss in zukünftigen Arbeiten weiter behandelt werden.

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse könnten verschiedene Möglichkeiten der Regulation durch den kleinen Leserahmen OrfC vorhanden sein.

Nach Ergebnissen von KRIESE (unpubl.) wirkt das *C.HgiEI* weder auf die Expression der Endonuklease *R.HgiEI* noch der Methyltransferase *M.HgiEI*. Zusätzlich konnte er bei Deletionen im C-terminus von *C.HgiEI* keinen Einfluss dieser Mutationen auf die Klonierung von *RM.HgiEI* beobachten.

Durch MEYER-ROGGE (1997) konnte bei Untersuchungen an *C.HgiCII* gezeigt werden, dass dessen Expressionsrate relativ niedrig ist. MEYER-ROGGE führte dies auf eine von *E.coli* abweichende *codon-usage* zurück, welches bei *C.HgiCII* benutzt wird. Allerdings erklärt das nicht, warum *R.HgiCII*, isoliert aus demselben Organismus, gleichzeitig gut exprimierbar ist.

Wahrscheinlicher als eine direkte Wirkung des OrfC als Protein ist aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse ein Einfluss des Abschnittes zwischen *C.HgiEI* und Methyltransferase. Zwischen den beiden Leserahmen liegt ein Abschnitt von 172 Basenpaaren. Innerhalb dieser Sequenz befindet sich auch die Shine-Dalgarno-Sequenz für *M.HgiEI*, welche sehr stark mit der Consensus-Sequenz für eine Ribosomen-Bindungsstelle (KOZAK 1999) übereinstimmt. Obwohl dieser eigene Promotor vermutlich weitaus schwächer als der *LacZ*-Promotor ist, ist die Expressionsrate von *M.HgiEI* ausreichend, um die Zelle entweder vor *R.HgiEI* oder der Mutante *R.HgiBI* S176N zu schützen. Die schwächere Expression der Methyltransferase hat auch vermutlich einen Einfluss auf die Expressionsrate von *R.HgiEI* bzw. *R.HgiBI* S176N. Sie sollten schwächer abgelesen werden, als wenn *M.HgiEI* als *LacZ<sub>α</sub>*-Fusion vorliegt.

Allerdings werden die Verhältnisse unübersichtlich, sobald die Systeme auf multicopy-Plasmiden vorliegen und nicht bis ins letzte Detail erklärbar. Die Evolution des RM-Systems ist zwangsläufig in vormethylierten Zellen erfolgt, so dass sich unter dem ursprünglichen Schutz eine neue Aktivität eventuell möglicherweise parallel entwickeln konnte. Diese Verhältnisse sind in vitro nicht simulierbar.

## 5.6 Generierung einer fragmentierten Methyltransferase *M.HgiBI* ohne GGSCC-Aktivität

Im Zuge der Herstellung der Klone für die Bestimmung der Nebenaktivität der Methyltransferasen wurde eine Mutante hergestellt, die durch eine Mutation in zwei Protein-Hälften geteilt worden war. Die hieraus resultierenden Hälften der Methyltransferase *M.HgiBI* stellten in ihrer Kombination nicht mehr die vollständige Methyltransferase dar. Ein Teil der *target recognition domain* war deletiert. Diese Deletionsmutante von *M.HgiBI* war noch in der Lage, die Sequenz GGWCC zu methylieren, konnte aber nicht mehr die Sequenz GGSCC methylieren. Daraus kann man schließen, dass zum einen die GGWCC-Aktivität von dieser Deletion nicht beeinflusst wird, zum anderen befinden sich in diesem Teil der *target recognition domain* die Aminosäuren, welche die Erkennung von GGSCC ermöglichen. Eine der Mutanten von *M.HgiBI* weist ebenfalls keine GGSCC-Aktivität mehr auf (*M.HgiBI* D215E). Diese Position liegt innerhalb der deletierten Sequenz. Daher kann man sagen, dass mindestens diese Aminosäure tatsächlich für die Erkennung der Sequenz GGSCC mit verantwortlich ist.

## 5.7 Klonierung von Methyltransferasen in *E.coli* BL21

Wie in Abschnitt 4.1 dargestellt, wurde ermittelt, ob die Expressionsrate von *M.HgiEI*, *M.HgiBI* und *M.HgiCII* über einen ATGA-Übergang erhöht werden konnte. Diese Klonierungen wurden zunächst in SURE<sup>®</sup>-Zellen erfolglos durchgeführt, obwohl dieser *E.coli*-Stamm sehr oft für Klonierungen von Methyltransferasen verwendet wird und bei dem alle Gene für die Abwehr der Fremdmethylierung deletiert sind. Noch schlechter konnten diese Konstrukte in HB101-Zellen erhalten werden. Der Grund hierfür ist das Vorhandensein von *mcrA* in HB101, das ebenfalls ein Teil der Fremdmethylierungsabwehr ist und vermutlich bei der Abwehr der GGSCmC-Methylierung verantwortlich ist (RALEIGH und WILSON 1986, NOYER-WEIDNER *et al.* 1986, RALEIGH *et al.* 1989). Im Gegensatz dazu stellte sich heraus, dass der nicht vollständig für diese Klonierung von Methyltransferasen optimierte Stamm BL21 für die Klonierung der ATGA-Konstrukte sehr gut geeignet ist. Bei diesem *E.coli*-Stamm ist lediglich das Gen *mcrA* der Fremdmethylierungs-Abwehr deletiert. Weitere Nachforschungen ergaben, dass zusätzlich zu diesem Gen *dcm* und *vsr* deletiert sind. Komplementation von BL21 mit *vsr* und *dcm* bzw. *vsr* zeigte lediglich im Falle von *vsr* einen Unterschied in der Transformationseffizienz von ATGA-Konstrukten von *M.HgiCII*, *M.HgiEI* und *M.HgiBI* im Gegensatz zu nicht-komplementierte BL21-Zellen. Der Unterschied entsprach der Transformationseffizienz, die bei HB101 zu finden ist. Hier ist lediglich *mcrA* deletiert. Aus diesen Ergebnissen heraus lässt sich schließen, dass auch

*vsr* bei der Abwehr von GGWCC- und/oder GGSCC-Methylierung eine Rolle spielen muss. Der molekulare Mechanismus soll in zukünftigen Arbeiten weiterverfolgt werden.



## 6 Abstract

The aim of this work is to simulate the natural formation of a new Restriction-Modification-System (RM-system) by cloning the S176N mutant of restriction endonuclease R.*Hgi*BI, which could not be achieved by other authors, before. The reason for this failure should either be the gaining of a new specificity or an increased activity, which cannot be controlled by the wildtype methyltransferase M.*Hgi*BI, anymore.

The three closely related RM-Systems RM.*Hgi*BI, RM.*Hgi*CII and RM.*Hgi*EI were used as wildtype references. Using several variants of the methyltransferase M.*Hgi*BI it was possible to isolate the mutant in demand R.*Hgi*BI S176N. In addition, this mutant could be obtained in the presence of either M.*Hgi*BI or M.*Hgi*EI in the presence of a small open reading frame called orfC for control orf. This orfC was shown to be necessary for cloning both the RM.*Hgi*EI and the RM.*Hgi*CII system, before. Controlling the expression of the wildtype R.*Hgi*BI it was not needed, but for cloning the S176N mutant thereof. Thus, it is speculated, that the orfC increases the expression rate of the respective methyltransferase.

Using bisulfite-sequencing the activity as well as the specificity of the respective methyltransferases has been investigated thoroughly. It turned out, that both the methyltransferases M.*Hgi*BI and M.*Hgi*EI possess the capability to methylate the sequence GGSCC in addition to the main target sequence GGWCC, while the third methyltransferase M.*Hgi*CII lacks this capability. However, this third methyltransferase is more active in methylating the main target sequence GGWCC.

Thereafter, the endonucleases have been checked for side activities by a newly developed strategy using the fairly convenient expression of the green fluorescence protein GFP. While the endonucleases R.*Hgi*CII and R.*Hgi*EI did not show any additional specificity, R.*Hgi*BI shows an additional activity in cutting the GAACC sequence.

By chance the methyltransferase M.*Hgi*BI has been split into two separate proteins. While the capability to methylate the GGSCC sequence was lost, the GAACC could now be methylated by this enzyme.

We could produce the seemingly unclonable mutant R.*Hgi*BI S176N by using four different variants of methyltransferases. It was possible to clone this endonuclease mutant with variants of methyltransferases that were stronger than the wildtype M.*Hgi*BI. This result shows that R.*Hgi*BI S176N is a stronger endonuclease than the wildtype. It hasn't gained any additional specificity.

## 7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die natürliche Bildung eines neuen Restriktions-Modifikationssystem anhand des Beispiels der als nicht klonierbar geltenden S176N Mutante des Restriktionsenzym *R.HgiBI* nachzuahmen. Die Nichtklonierbarkeit dieser Mutante sollte dabei entweder durch eine neue Spezifität oder durch eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Aktivität hervorgerufen werden, die nicht mehr durch die Methyltransferase *M.HgiBI* abgedeckt wird.

Als Untersuchungsobjekt boten sich die drei sehr nahe miteinander verwandten RM-Systeme *RM.HgiBI*, *RM.HgiCII* und *RM.HgiEI* an. In Gegenwart verschiedener Varianten der Methyltransferase *M.HgiBI* gelang es, die gesuchte S176N auch für *R.HgiBI* herzustellen. Ferner gelang es dieselbe vorher nicht erhaltene Mutante herzustellen, wenn neben einer der beiden Methyltransferasen *M.HgiBI* oder *M.HgiEI* auch noch ein kleiner offener Leserahmen (*orfC*) aus den RM-Operon anwesend war. Dieser sog. control *orfC* wurde bisher nur bei der Klonierung von *R.HgiEI* und *R.HgiCII* benötigt. Es wird daher spekuliert, dass dieser *OrfC* die Expressionsrate der Methyltransferasen positiv beeinflusst.

Sowohl die Spezifität als auch die Aktivität der Methyltransferasen konnte durch die intensive Nutzung der DNA-Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung aufgeklärt werden. Während sowohl *M.HgiBI* als auch *M.HgiEI* neben der Haufterkennungssequenz GGWCC auch die verwandte Sequenz GGSCC methyliert, während die dritte Methyltransferase *M.HgiCII* diese Aktivität nicht zeigt. Umgekehrt ist *M.HgiCII* aber deutlich aktiver in der Methylierung der Hauptsequenz GGWCC.

Schließlich wurden die drei Endonuklease mit einer speziell entwickelten Strategie darauf untersucht, ob sie neben der Haufterkennungssequenz auch andere Sequenzen erkennen. Die Verwendung eines sehr bequemen Expressionsassays für das grün fluoreszierende Protein GFP ließ schnell erkennen, dass die beiden Endonukleasen *R.HgiCII* und *R.HgiEI* keinerlei zusätzliche Spezifitäten besitzen. Nur *R.HgiBI* zeigt eine zusätzliche Aktivität, bei der die Sequenz GAACC spezifisch geschnitten wird.

Durch Zufall wurde das Gen für die Methyltransferase *M.HgiBI* in zwei Proteine aufgeteilt. Während die Fähigkeit die Sequenz GGSCC zu methylieren verloren ging, konnte nun die bei der zugehörigen Endonuklease gefundene Sequenz GAACC methyliert werden.

Die bis *dato* nicht erhaltene Mutante *R.HgiBI* S176N konnte in vier Fällen hergestellt werden. Es stellte sich heraus, dass deren Klonierung nur mit starken Methyltransferase-Varianten möglich ist. Das beweist, dass die Nichtklonierbarkeit dieser Mutante auf der Stärke der Endonuklease beruht.

## 8 Literatur

- ADAMS, G.M. and BLUMENTHAL, R.M. (1995): Gene *pvuHW*: a possible modulator of *PvuII* endonuclease subunit association. *Gene* **157** 193-199
- ANTON, B.P., HEITER, D.F., BENNER, J.S., HESS, E.J., GREENOUGH, L., MORAN, L.S., SLATKO, B.E. and BROOKS, J.E. (1997): Cloning and characterization of the *BglII* restriction-modification system reveals a possible evolutionary footprint. *Gene* **187**, 19–27
- ARBER, W. and DUSSOIX, D. (1962): Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. Host controlled modification of bacteriophage  $\lambda$ . *J. Mol. Biol.* **5**, 18–36
- Arber, W. and WAUTER-WILLIAMS, D. (1970): The two restriction and modification systems of the strain 15T<sup>-</sup>. *Mol. Gen. Genet.* **108**, 203-217
- BAKER, D. J., KAN, J. L. C. and SMITH, S. S. (1988) Recognition of structural perturbations in DNA by human DNA (cytosine5) methyltransferase. *Gene* **74**, 207-10
- BANDARU, B., GOPAL, J. and BHAGWAT, A. S. (1996): Overproduction of DNA Cytosine Methyltransferases Causes Methylation and C  $\rightarrow$  T Mutations at Non-canonical Sites. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 7851–7859
- BARANY, F., SLATKO, B., DANZITZ, M., COWHURN, D., SCHILDKRAUT, I. and WILSON, G.G. (1992): The corrected nucleotide sequences of the *TaqI* restriction and modification enzymes reveal a thirteen-codon overlap. *Gene* **112**, 91-95
- BERTANI, G. and WEIGLE, J. J. (1953). Host-controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **65**, 113–121
- BLUM, E. (1995): Aufreinigung, Aktivitätsbestimmung und Mutagenese der *AvaII*-isoschizomeren Restriktionsendonukleasen *HgiBI*, *HgiEI* und *HgiCII*. *Dissertation* Justus-Liebig-Universität Giessen.
- BLUM, E., HORST, G. and KRÖGER, M. (1994): PCR-directed preparation and single-step purification of the highly active histidine-tagged restriction endonuclease *HgiBI* (GGWCC). *Gene* **157**, 107-108
- BOYER, H.W. and ROULLAND-DUSSOIX, D. (1969): A Complementation Analysis of the Restriction and Modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**, 459-472
- BROOKS, J. E., BENNER, J. S., HEITER, D. F., SILBER, K. R., SZNYTER, L. A., JAGER-QUINTON, T., MORAN, L. S., SLATKO, B. E., WILSON, G. G. and NWANKWO, D. O. (1988): Cloning the *BamHI* restriction modification system. *Nucleic Acids Res.* **17**, 979-997
- BUJNICKI, J. M. (2001): Understanding the evolution of restriction-modification systems: Clues from sequence and structure comparisons. *Acta biochimica polonica*, **48**, 935-967
- BUTLER, D. and FITZGERALD, G.F. (2001): Transcriptional Analysis and Regulation of Expression of the *ScrFI* Restriction- Modification System of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC503, *J. Bacteriol.* **183**, 4668– 4673

- CASERTA, M., ZACHARIAS, W., NWANKWO, D., WILSON, G. G. and WELLS, R. D. (1987): Cloning, sequencing, in vivo promoter mapping, and expression in *Escherichia coli* of the gene for the *HhaI* methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **262**, 4770-4777
- ČESNAVIČIENĖ, E., MITKAITĖ, G., STANKEVIČIUS, K., JANULAITIS, A. and LUBYS, A. (2003): Esp1396I restriction-modification system: structural organization and mode of regulation. *Nucleic Acids Res.* **31**, 743-749
- CHEN, L., MACMILLAN, A. M., CHANG, W., EXAX-NIKPAY, K., LANE, W. S., and VERDINE, G.L. (1991): Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine5)-methyltransferase. *Biochemistry* **30**, 11018-11025
- CHENG, X., KUMAR, S., POSFAI, J., PFLUGRATH, J. W. and ROBERTS, R. J. (1993): Crystal structure of the *HhaI* methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* **74**, 299-307
- CHENG, X. (1995): Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 293-318
- COHEN, M.H., TAWFIK, D.S. and GRIFFITHS, A.D. (2004): Altering the sequence specificity of *HaeIII* methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization. *Prot. Eng. Des. Sel.* **17**, 3-11
- DÜSTERHÖFT, A. (1990): Klonierung von Restriktions-Modifikationssystemen aus *Herpetosiphon giganteus* *HpaI* und *Hpa2* und *Hpg5* in *E.coli*- Charakterisierung und vergleichende Analyse der genetischen Organisation und Struktur. *Dissertation* Justus Liebig Universität **Giessen**.
- DÜSTERHÖFT, A., ERDMANN, D. and KRÖGER, M. (1991): Isolation and genetic structure of the *AvaII* isoschizomeric restriction-modification system *HgiBI* from *Herpetosiphon giganteus* *Hpg5*: M-*HgiBI* reveals high homology to M-*BanI*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3207-3211
- EISENSCHMIDT, K. (2005): Entwicklung eines programmierbaren Restriktionsenzym. *Dissertation* Justus Liebig Universität **Giessen**.
- ERDMANN, D. (1991) Klonierung von Restriktions-Modifikationssystemen aus *Herpetosiphon giganteus* *Hpg9* und *Hpg24* in *E.coli* – Charakterisierung und vergleichende Analyse der genetischen Organisation und Struktur. *Dissertation* Justus Liebig Universität **Giessen**.
- ERDMANN, D., DÜSTERHÖFT, A. and KRÖGER, M. (1991): Cloning and molecular characterization of the *HgiCI* restriction modification system from *Herpetosiphon giganteus* *Hpg9* reveals high similarity to *BanI*. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1247-1256
- ERDMANN, D., HORST, G., DÜSTERHÖFT, A. and KRÖGER, M. (1992): Stepwise cloning and genetic organization of the seemingly unclonable *HgiCII* restriction-modification system from *Herpetosiphon giganteus* strain *Hpg9*, using PCR technique. *Gene* **117**, 15-22
- Falgenhauer, L. (2008): Änderung der Erkennungsspezifität bei Hybriden aus verwandten Methyltransferasen. *Diplomarbeit*, Justus Liebig Universität **Giessen**.
- FROMMER, M., McDONALD, L. E., MILLAR, D. S., COLLIS, C. M., WATT, F., GRIGG, G. W., MOLLOY, P. L., and PAUL, C. L. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1827-1831

- GEIGER R, RÜTER T, ALVES J, FLIESS A, WOLFES H, PINGOUD V, URBANKE C, MAASS G, PINGOUD A, DÜSTERHÖFT A and KRÖGER, M. (1989): Genetic engineering of *EcoRI* mutants with altered amino acid residues in the DNA binding site: physicochemical investigations give evidence for an altered monomer/dimer equilibrium for the Gln144Lys145 and Gln144Lys145Lys200 mutants. *Biochemistry* **28**, 2667-77
- GUAN, S., BLANCHARD, A., ZHANG, P. and ZHU, Z. (2010) Alteration of Sequence Specificity of the Type IIS Restriction Endonuclease BtsI. *PLoS ONE* **5**(7): e11787
- GÖKYILDIRIM, M.Y. (2011): Versuche zur Expression des theoretischen Leserrahmens *ninA* aus dem Bakteriophagen lambda. *Bachelorthesis* Justus Liebig Universität **Giessen**
- HENDRIX, R. W., ROBERTS, J. W., STAHL, F. W., and WEISBERG, A. (1982): Lambda II. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.
- HEMSLEY, A., ARNHEIM, N., TONEY, M.D., CORTOPASSI, G. and GALAS, D.V. (1989): A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* **17**, 6345-6551
- HOCHULI E., DÖBELI H. and SCHACHER A. (1987): New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr.* **411**, 177-84
- HOCHULI E., BANNWARTH W., DÖBELI H., GENTZ R. and STÜBER D. (1988): Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nature Biotechnol.* **6**, 1321- 1325
- IVES, C.L., NATHAN, P.D. and BROOKS, J.E. (1992): Regulation of the *BamHI* restriction-modification system by a small intergenic open reading frame, *bamHIC*, in both *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 7194–7201
- JANKNECHT, R., DE MARTYNOFF, G., LOU, J., HIPSKIND, R.A., NORDHEIM, A. and STUNNENBERG, H.G. (1991): Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *PNAS* **88**, 8972-6
- JELTSCH, A., KRÖGER, M. and PINGOUD, A. (1995): Evidence for an evolutionary relationship among type-II restriction endonucleases. *Gene* **160**, 7–16.
- JELTSCH, A. (2002): Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBioChem* **3**, 274 – 293
- JEONG, H., BARBE, V., LEE, C.H., VALLENET, D., YU, D.S., CHOI, S.H., COULOUX, A., LEE, S.W., YOON, S.H., CATTOLICO, L., HUR, C.G., PARK, H.S., SÉGURENS, B., KIM, S.C., OH, T.K., LENSKI, R.E., STUDIER, F.W., DAEGELEN, P. and KIM, J.F. (2009): Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3). *J Mol Biol.* **394**, 644-52
- JURĖNAITĖ-URBANAVIČIENĖ, S., ŠERKŠNAITĖ, J., KRIUKIENĖ, E., GIEDRIENĖ, J., VENCLOVAS, Č. and LUBYS, A. (2007): Generation of DNA cleavage specificities of type II restriction endonucleases by reassortment of target recognition domains. *PNAS* **104**, 10358-10363.
- KARCH, H., SCHMIDT, H., JANETZKI-MITTMANN, C., SCHEEF, J. AND KRÖGER, M. (1999): Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genome of related temperate bacteriophages. *Mol Gen Genet*, **262**, 600-607.

- KARREMAN, C. and DE WAARD, A. (1990): *Agmenellum quadruplicatum* M *AquI*, a Novel Modification Methylase. *J. Bacteriol.* **172**, 266-272
- KARYAGINA, A., SHILOV, I., TASHLITSKII, V., KHODOUN, M., VASIL'EV, S., LAU, P.C.K. and NIKOLSKAYA, I. (1997): Specific Binding of *SsoII* DNA Methyltransferase to Its Promoter Region Provides the Regulation of *SsoII* Restriction- Modification Gene Expression, *Nucl. Acids Res.*, **25**, 2114–2120.
- KIM Y. C., GRABLE J. C., LOVE R., GREENE P. J. and ROSENBERG J. M. (1990): Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing. *Science* **249**, 1307–1309.
- KISS, A., POSFAI, G., KELLER, C.C., VENETIANER, P. and ROBERTS, R.J. (1985): Nucleotide sequence of the *BsuRI* restriction-modification system. *Nucl. Acids Res.* **13**, 6403-6421
- KLIMAŠAUSKAS, S., NELSON, J. L., and ROBERTS, R. J. (1991): The sequence specificity domain of cytosine C5 methylases. *Nucl. Acids Res.* **79**, 8183-6190
- KLIMAŠAUSKAS, S., KUMAR, S., ROBERTS, R. J. and CHENG, X. (1994): *HhaI* methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**, 357–369
- KOZAK, M. (1999): Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes *Gene* **234**, 187–208
- KRIESE, J. (1996): Herstellung und Charakterisierung von Aktivitätsvarianten der Endonuklease *HgiBI*. *Diplomarbeit*, Justus Liebig Universität **Giessen**.
- KRÖGER, M., HOBOM, G., SCHÜTTE, H. and MAYER, H. (1984): Eight new restriction endonucleases from *Herpetosiphon giganteus*- divergent evolution in a family of enzymes. *Nucleic Acids Res.* **12**, 3127-3141.
- KRÖGER, M. and HOBOM, G. (1982): A chain of interlinked genes in the *ninR* region of bacteriophage lambda. *Gene* **20**, 25-38
- KUMAR, S., CHENG, X., KLIMAŠAUSKAS, S., MI, S., POSFAI, J., ROBERTS, R.J. and WILSON, G.G. (1994): The DNA (cytosine-5) Methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1-10
- LANIO, T., JELTSCH, A. and PINGOUD, A. (2000): On the possibilities and limitations of rational protein design to expand the specificity of restriction enzymes: A case study employing *EcoRV* as a target. *Protein Eng.* **13**, 275-281
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- LAEMMLI, U.K. and FEVRE, M. (1973): Maturation of head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**, 575-599
- LIU, Y., ICHIGE, A. and KOBAYASHI, I. (2007): Regulation of the *EcoRI* restriction-modification system: Identification of *ecoRIM* gene promoters and their upstream negative regulators in the *ecoRIR* gene. *Gene* **400**, 140–149
- LUBYS, A., JURENAITE, S., and JANULAITIS, A. (1997): Structural Organization of the Plasmid-Borne Restriction–Modification System Type II *Kpn2I* from *Klebsiella pneumonia* RLF2, *Nucleic Acids Res.* **27**, 4228– 4234

- LURIA, S. E. and HUMAN, M. L. (1952): A non-hereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **64**, 557-569
- MADEJ, T., ADDESS, K.J., FONG, J.H., GEER, L.Y., GEER, R.C., LANCZYCKI, C.J., LIU, C., LU, S., MARCHLER-BAUER, A., PANCHENKO, A.R., CHEN, J., THIESSEN, P.A., WANG, Y., ZHANG, D. and BRYANT, S.H. (2012): MMDB: 3D structures and macromolecular interactions. *Nucleic Acids Res.*, **40** (Database issue), D461-4
- MANIATIS, T., FRITSCH and E. F. SAMBROOK, J. (1982): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.
- MATTHEWS, K.S. (1992) DNA Looping. *Microbiol Rev* 1992 **56**, 123-136
- MCCLARIN, J.A., FREDERICK, C.A., WANG, B.-C., GREENE, P.; BOYER, H.W., GRABLE, J., and ROSENBERG, J.M. (1986): Structure of the DNA-*EcoRI*-Endonuclease recognition complex at 3Å resolution. *Science* **234**, 1526-41
- MCGEEHAN J.E., STREETER S.D., THRESH S.-J., TAYLOR J.E.N., SHEVTSOV, M.B. AND KNEALE G.G. (2011): Structural Analysis of a Novel Class of R–M Controller Proteins: C.*Csp231I* from *Citrobacter* sp. RFL231. *J Mol Biol.* **409**, 177–188
- MERKL, R., KRÖGER, M., RICE, P. and FRITZ, H.J. (1992): Statistical evaluation and biological interpretation of non-random abundance in the *E. coli* K-12 genome of tetra- and pentanucleotide sequences related to VSP DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1657-62
- MEYER-ROGGE, S. (1993): Regulation der Expression des Restriktionsenzymes *TaqI*. *Diplomarbeit*, Justus Liebig Universität **Giessen**.
- MEYER-ROGGE, S. (1997): Aufreinigung und Charakterisierung des C-Proteins des Restriktions-Modifikations-Systems *HgiCI* aus dem Bodenbakterium *Herpetosiphon giganteus*. *Dissertation* Justus Liebig Universität **Giessen**.
- MULLIS, K.B. and FALOONA, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-50
- MRUK, I., RAJESH, P. and BLUMENTHAL, R.M. (2007) Regulatory circuit based on autogenous activation-repression: roles of C-boxes and spacer sequences in control of the *PvuII* restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6935–6952
- MRUK, I., LIU, Y. GE, L. and KOBAYASHI, I. (2011): Antisense RNA associated with biological regulation of a Restriction–Modification System. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5622–5632
- MURRAY, N.E. (2000): Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and molecular biology reviews* **64**, 412–434
- NAGORNYKH, M.O., BOGDANOVA, E.S., PROTSENKO, A.S., SOLONIN, A.S., ZAKHAROVA, M.V. and SEVERINOV, K.V. (2008): Regulation of Gene Expression in a Type II Restriction–Modification System. *Russian Journal of Genetics* **44**, 523–532
- NOYER-WEIDNER, M., DIAZ, R. and REINERS, L. (1986): Cytosine-specific DNA modification interferes with plasmid establishment in *Escherichia coli* K-12: involvement of *rglB*. *Mol. Gen. Genet.* **205**, 469-475

- ORLOWSKI, J. and BUJNICKI, M.J. (2008) Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3552-3569
- PINARBASI, H., PINARBASI, E. and HORNBY D.P. (2003): The small subunit of *M.AquI* is responsible for sequence-specific DNA recognition and binding in the absence of the catalytic domain. *J Bacteriol.* **185**, 1284-1288
- PINGOUD, A., FUXREITER, M., PINGOUD, V. and WENDE, W. (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *CMLS* **62**, 685–707
- PÓSFAL, J., BHAGWAT, A. S., PÓSFAL, G. and ROBERTS, R.J. (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2421-35
- PÓSFAL, G., KIM, S.C., SZILÁK, L., KOVÁCS, A. and VENETIANER, P. (1991): Complementation by detached parts of GGCC-specific DNA methyltransferases. *Nucleic Acid Res.*, 19: 4843-4847
- RALEIGH, E. A., and WILSON, G. G. (1986): *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *PNAS* **83**, 9070–9074
- RALEIGH, E. A., TRIMARCHI, R., and REVEL, H. (1989): Genetic and physical mapping of the *mcrA* (*rglA*) and *mcrB* (*rglB*) loci of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **122**, 279–296
- REINISCH, K. M., CHEN, L., VERDINE, G. L. and LIPSCOMB, W. N. (1995) The crystal structure of *HaeIII* methyltransferase covalently complexed to DNA: An extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell* **82**, 143–153
- RIMŠELIENĖ, R., VAIŠVILA, R. and JANULAITIS, A. (1995): The *eco72IC* gene specifies a trans-acting factor which influences expression of both DNA methyltransferase and endonuclease from the *Eco72I* restriction-modification system. *Gene* **157**, 217–219
- ROBERTS, R.J., MYERS, P.A., MORRISON, A. and MURRAY, K. (1976): A specific endonuclease from *Haemophilus haemolyticus*. *J. Mol. Biol.* **103**, 199-208
- ROTH, M. and JELTSCH, A. (2001): Changing the target base specificity of the *EcoRV* DNA methyltransferase by rational *de novo* protein-design. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3137-3144
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *PNAS* **74**, 5463-5467
- SARAVANAN, M., VASU, K. and NAGARAJA V. (2008): Evolution of sequence specificity in a restriction enzyme by a point mutation. *PNAS* **105**, 10344-10347
- SMITH, S. S., KAPLAN, B. E., SOWERS, L. C. and NEWMAN, E. M. (1992): Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *PNAS* **89**, 4744-48
- SOM, S. and FRIEDMAN, S. (1994): Regulation of *EcoRII* Methyltransferase: Effect of Mutations on Gene Expression and in Vitro Binding to the Promoter Region. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5347–5353
- SOM, S. and FRIEDMAN, S. (1997): Characterization of the Intergenic Region Which Regulates the *MspI* Restriction- Modification System, *J. Bacteriol.* **179**, 964–967



- SOROKIN V., SEVERINOV K. and GELFAND M.S. (2009): Systematic prediction of control proteins and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res.* **37**, 441–451
- TAO, T. and BLUMENTHAL, R.M. (1992): Sequence and characterization of *pvuII*R, the *PvuII* endonuclease gene, and of *pvuII*C, its regulatory gene. *J. Bacteriol.* **174**, 3395-3398
- TAO, T., BOURNE, J. C., and BLUMENTHAL, R. M. (1991): A family of regulatory genes associated with type II restriction-modification systems. *J. Bacteriol.* **173**, 1367-1375
- TÍMÁR, E., GROMA, G., KISS, A. and VENETIANER, P. (2004): Changing the recognition specificity of a DNA-methyltransferase by *in vitro* evolution. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3898-3903
- TRAUTNER, T.A, PAWLEK, B., BEHRENS, B. and WILLERT, J. (1996): Exact size and organization of DNA target-recognizing domains of multispecific DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases. *EMBO J* **15**, 1434-1442
- TRIGLIA, T., PETERSON, M. G., and KEMP, D. J. (1988): A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acid Res.* **16**, 8186
- VAN DYKE M.W., SIRITO M. and SAWADOGO M. (1992): Single-step purification of bacterially expressed polypeptides containing an oligo-histidine domain. *Gene.* **111**, 99-104
- VJESURIER, R.M., CARLOCK, L., BLUMENTHAL, R.M. and DUNBAR, J.C. (2000): Role and mechanism of action of C. *PvuII*, a regulatory protein conserved among restriction-modification systems. *J. Bacteriol.* **182**, 477–487
- WAITE-REES, P. A., KEATING, C. J., MORAN, L. S., SLATKO, B. E., HORNSTRA, L. J. and BENNER, J. S. (1991): Characterization and expression of the *Escherichia coli* *Mrr* restriction system. *J. Bacteriol.* **173**, 5207–5219
- WALTER, J., TRAUTNER, T.A. and NOYER-WEIDNER M. (1992): High plasticity of multispecific DNA methyltransferases in the region carrying DNA target recognizing enzyme modules. *EMBO J.* **11**, 4445-4450
- WARNECKE, P. M., STIRZAKER, C., SONG, J., GRUNAU, C., MELKI, J. R. and CLARK, S. J. (2002): Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* **27**, 101-107
- WU, J.C. and SANTI, D.V. (1985): On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases. In Cantoni, G. I. and Razin, A. (eds.) *Biochemistry and Biology of DNA Methylation*. Alan R. Liss Inc., New York. pp. 119-129.
- WU, J. C. and SANTI, D. V. (1987): Kinetic and catalytic mechanism of *HhaI* methyltransferase. *J Biol Chem* **262**, 4778-4786
- WU, J. C. and SANTI, D. V. (1988): High level expression and purification of *HhaI* methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **16**, 703-717.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. and MESSING, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119
- ZHELEZNAYA, L.A., KAINOV, D.E., YUNUSOVA, A.K. and MATVIENKO, N.I. (2003): Regulatory C protein of the EcoRV modification-restriction system. *Biochemistry* **68**, 105–111

## 9 Anhang

### 9.1 Vektoren

*pKW6*

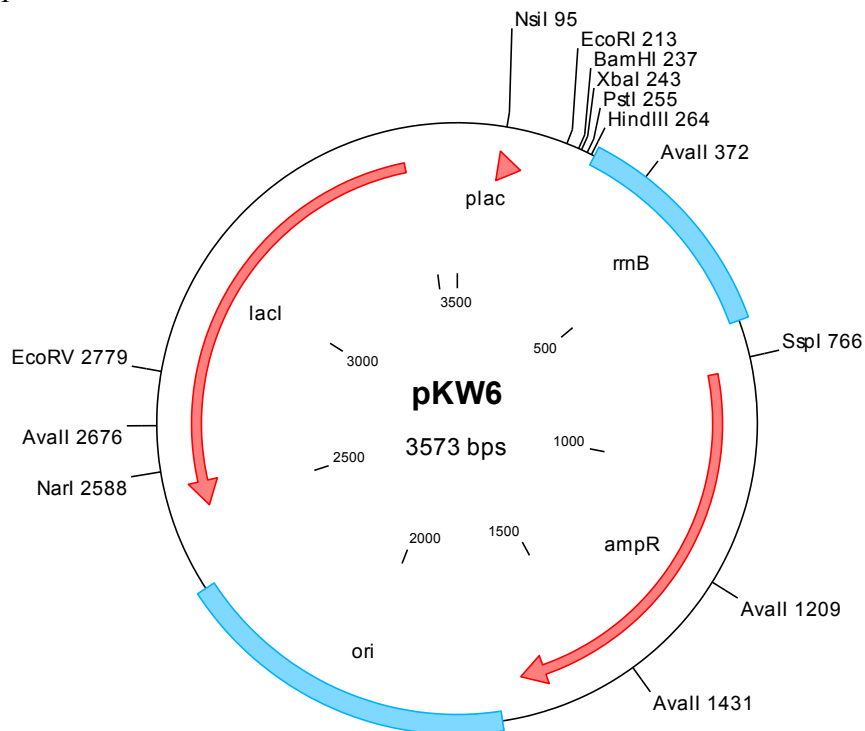


Abbildung 52: Plasmidkarte pKW6

*pEI-His*

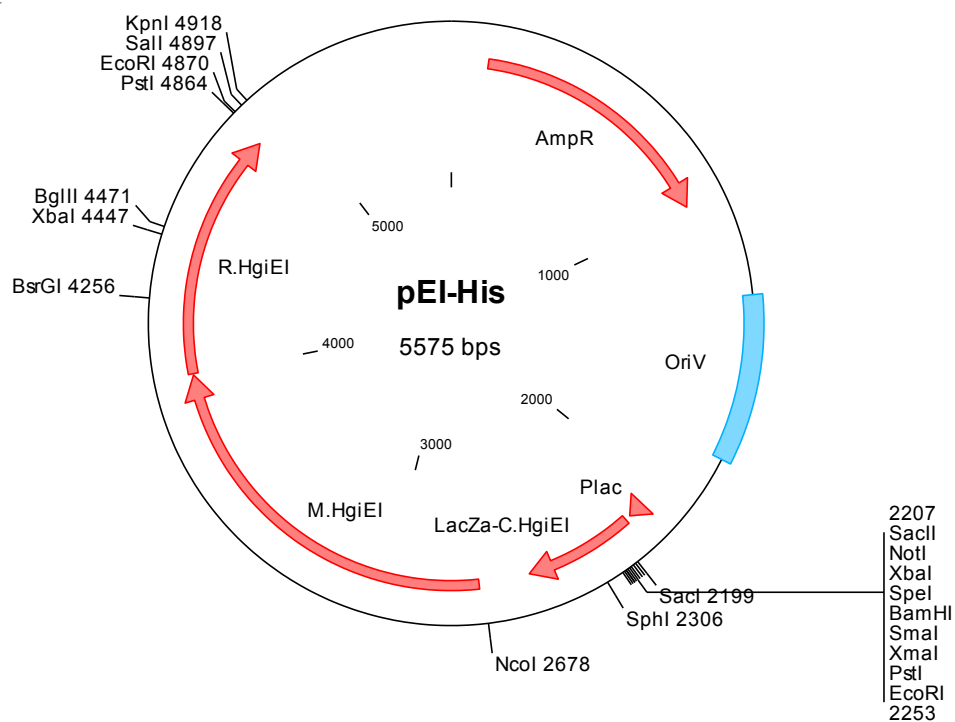


Abbildung 53: Plasmidkarte pEI-His

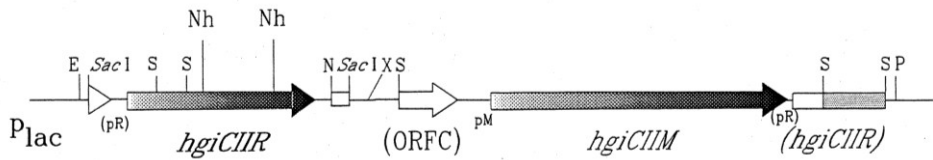
***pCII-His***

Abbildung 54 Schematische Darstellung der Anordnung der Gene in pCII-His.

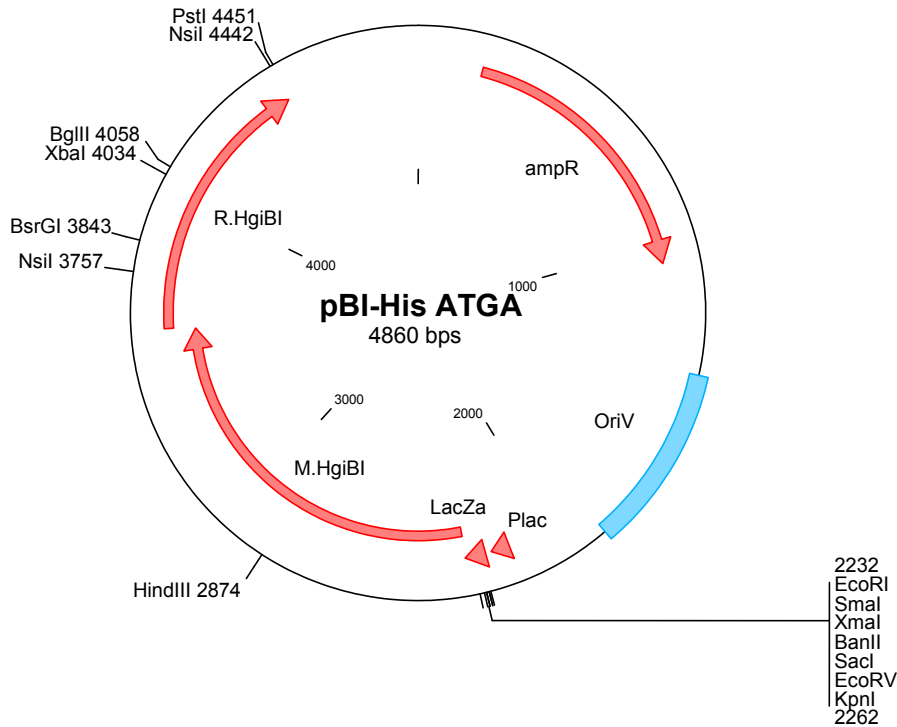
***pBI-His ATGA***

Abbildung 55: Plasmidkarte pBI-His + ATGA

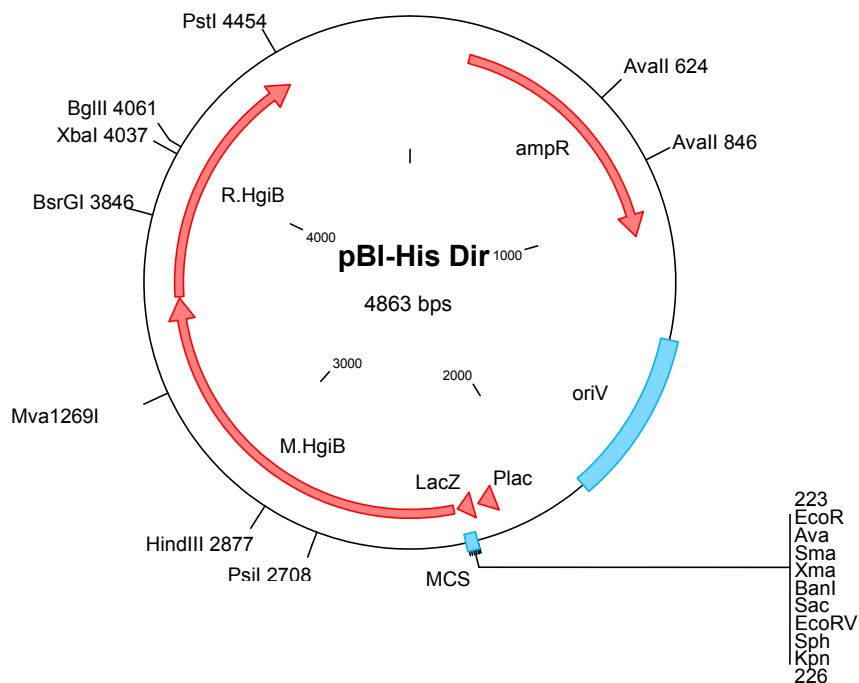
***pBI-His Dir***

Abbildung 56: Plasmidkarte pBI-His Dir

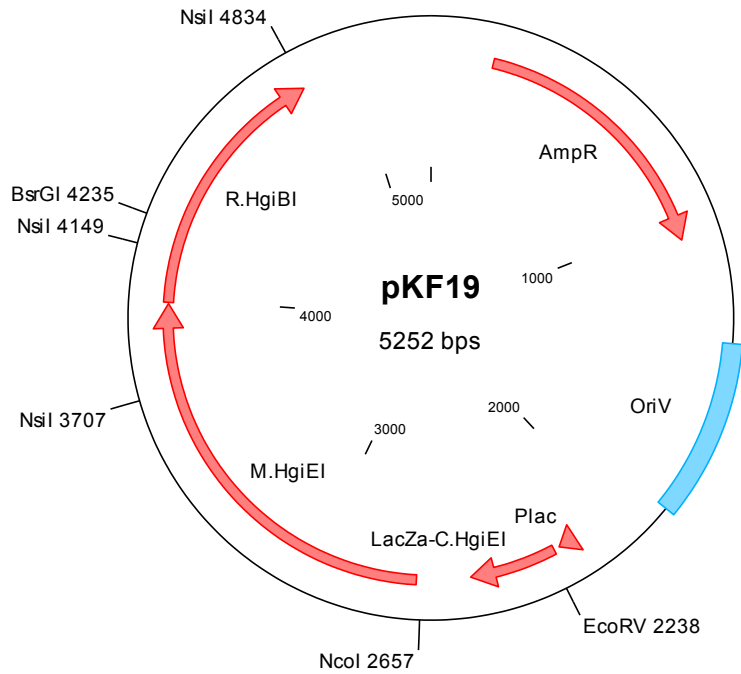
***pKF19***

Abbildung 57: Plasmidkarte pKF19

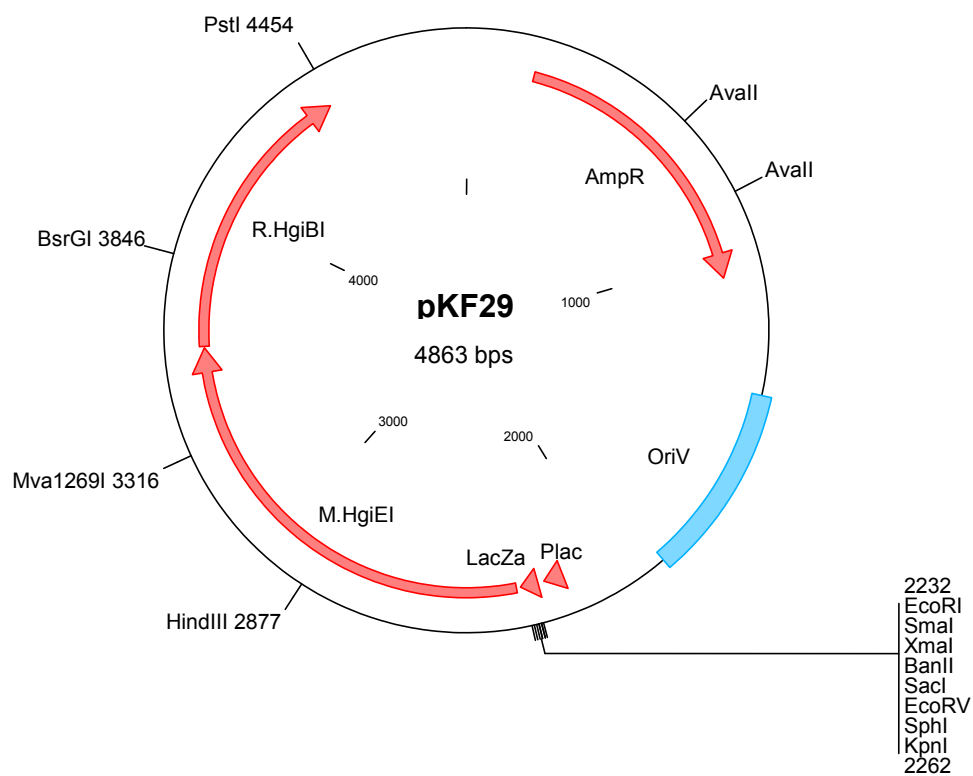
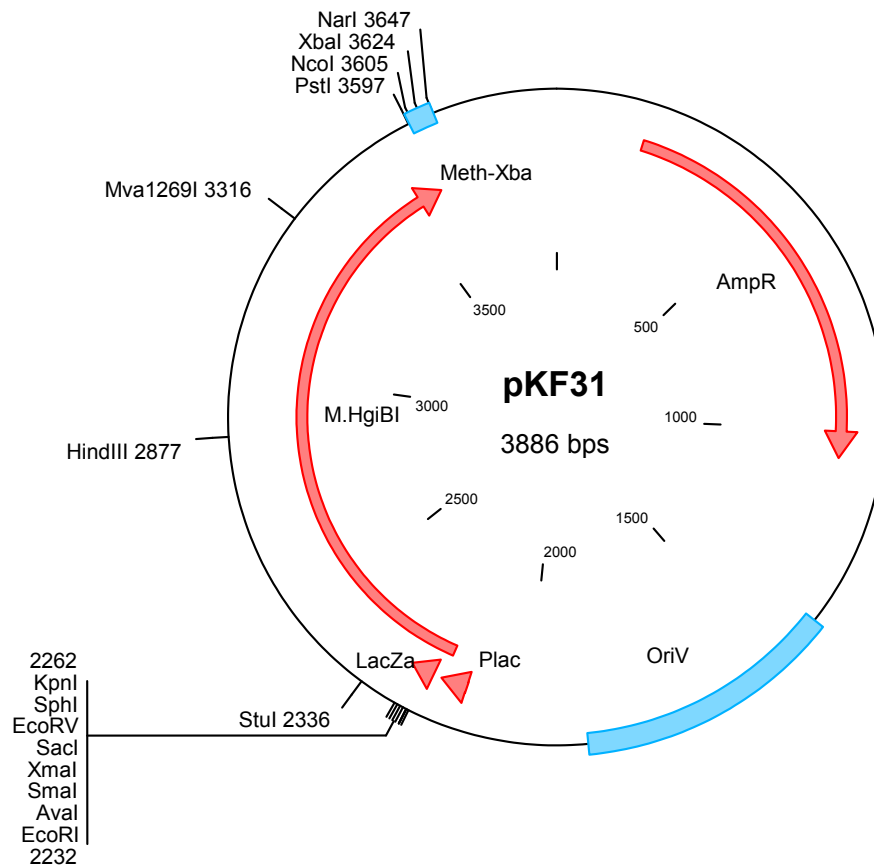
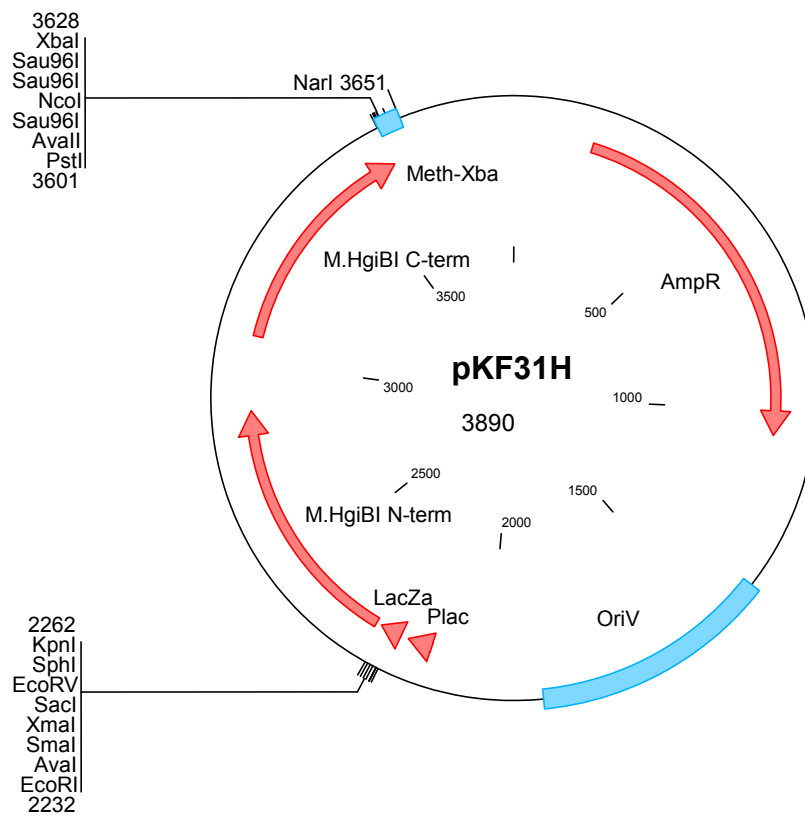
***pKF29***

Abbildung 58: Plasmidkarte pKF29

***pKF31*****Abbildung 59: Plasmidkarte pKF31*****pKF31H*****Abbildung 60: Plasmidkarte pKF31H**

### Mutanten von *pBIM-5*

Das Plasmid *pBIM-5* ist in Abbildung 18 dargestellt.

#### *pM.HgiBI D215E*

wie *pBIM-5*, aber Mutation an Position 289 und 290 der Aminosäuresequenz in *M.HgiBI*

#### *pM.HgiBI A289V G290D*:

wie *pBIM-5*, aber Mutation an Position 289 und 290 der Aminosäuresequenz in *M.HgiBI*

### *ATGA BI*

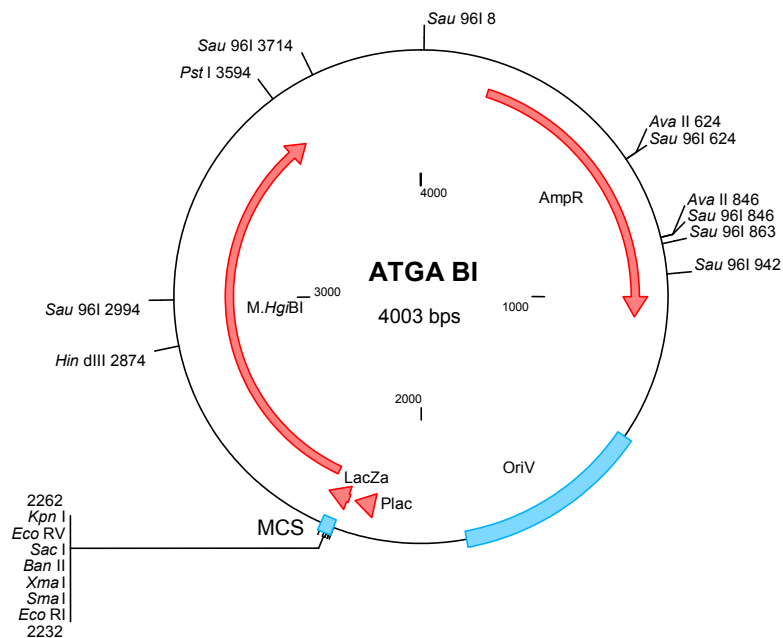


Abbildung 61: Plasmidkarte ATGA BI

### *ATGA EI*

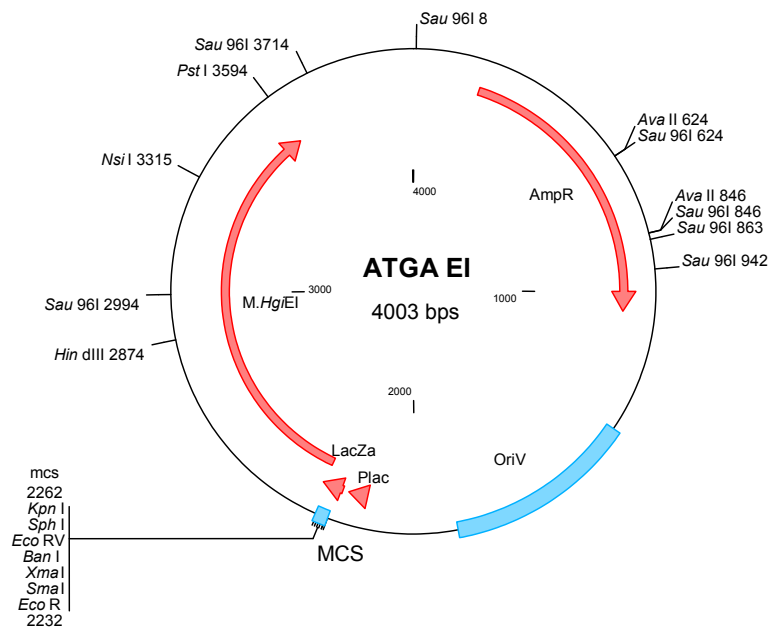
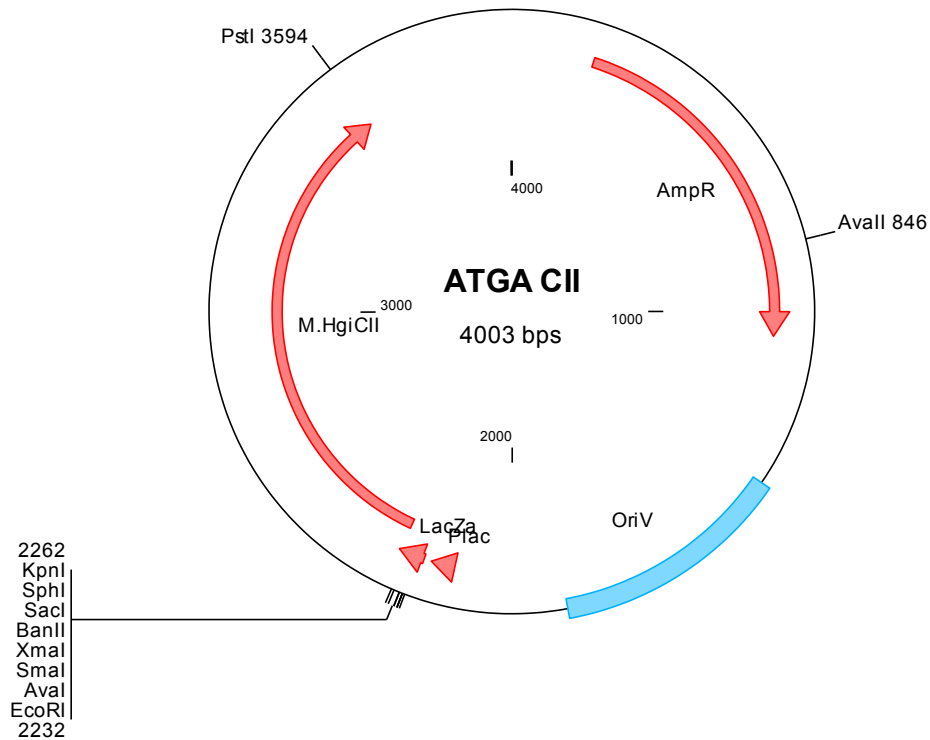
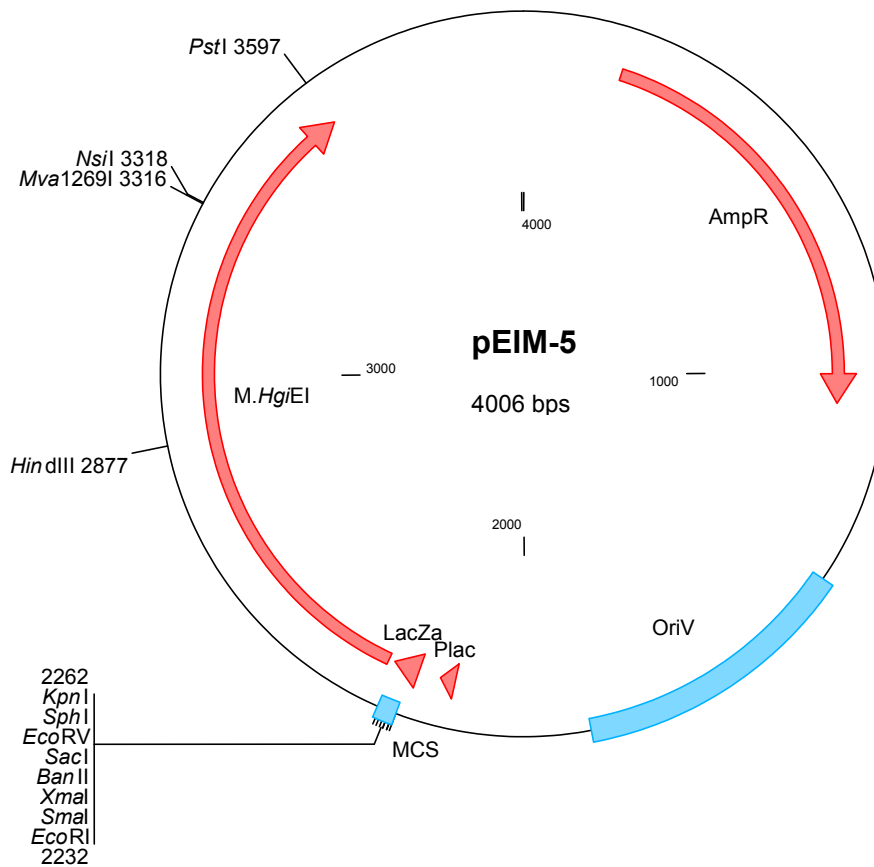


Abbildung 62: Plasmidkarte ATGA EI

***ATGA CII*****Abbildung 63: Plasmidkarte ATGA CII*****pEIM-5*****Abbildung 64: Plasmidkarte von pEIM-5.**

***pM.HgiEI E215D***

gleich wie pEIM-5, aber Mutation an Aminosäureposition 215 in Methyltransferase-Gen

***pM.HgiEI V289A***

gleich wie pEIM-5, aber Mutation an Aminosäureposition 289 in Methyltransferase-Gen

***pM.HgiEI D290G***

gleich wie pEIM-5, aber Mutation an Aminosäureposition 290 in Methyltransferase-Gen

***pM.HgiEI V289A D290G***

gleich wie pEIM-5, aber Mutation an Aminosäureposition 289 und 290 in Methyltransferase-Gen

***pM.HgiEI E215D V289A***

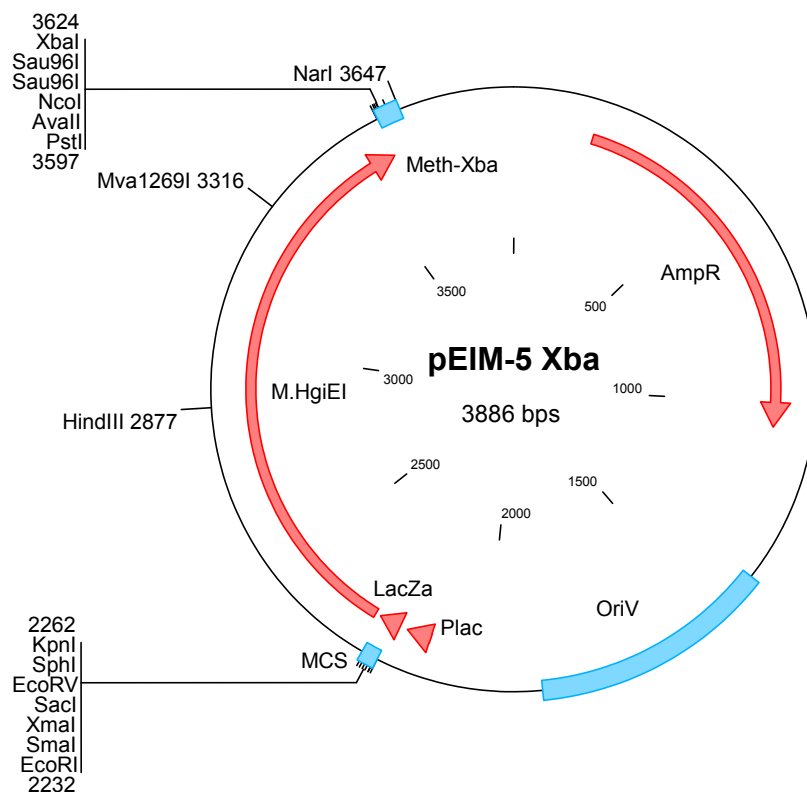
gleich wie pEIM-5, aber Mutation an Aminosäureposition 215 und 289 in Methyltransferase-Gen

***pM.HgiEI E215D D290G***

gleich wie pEIM-5, aber Mutation an Aminosäureposition 215 und 290 in Methyltransferase-Gen

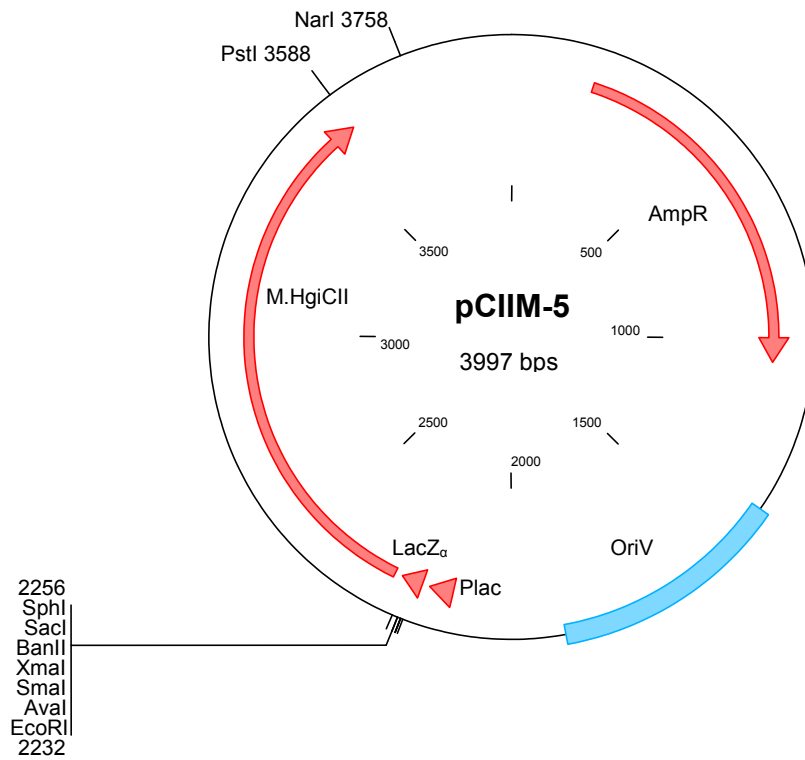
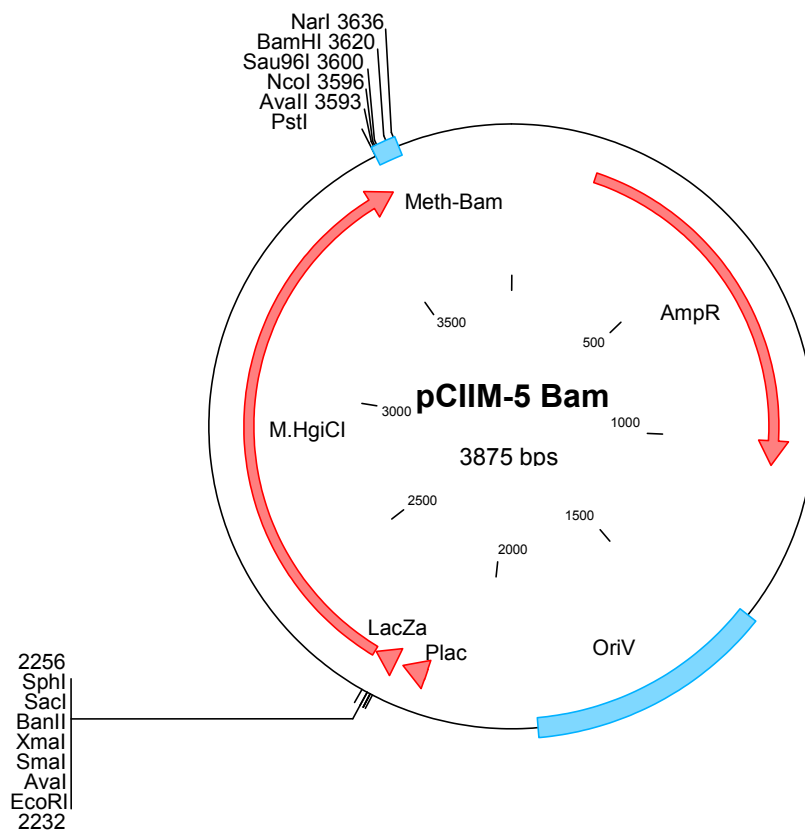
***pM.HgiEI E215D V289A D290G***

gleich wie pEIM-5, aber Mutation an Aminosäureposition 215, 289 und 290 in Methyltransferase-Gen

***pEIM-5 Xba***

**Abbildung 65: Plasmidkarte Vektor pEIM-5 Xba**



***pCIIM-5*****Abbildung 66: Plasmidkarte pCIIM-5*****pCIIM-5 Bam*****Abbildung 67: Plasmidkarte pCIIM-5 Bam**

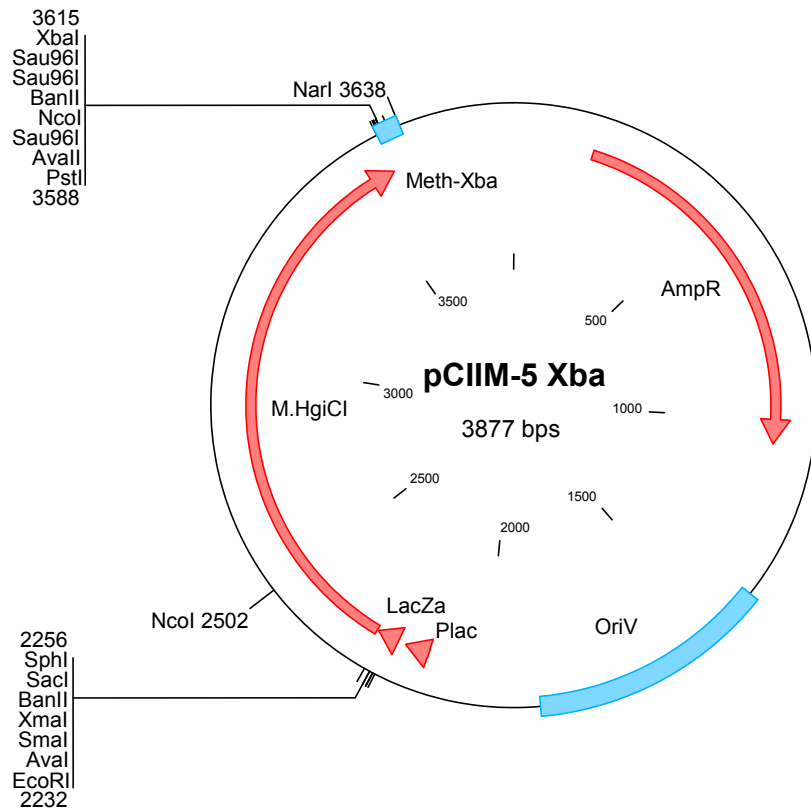
***pCIIM-5 Xba***

Abbildung 68: Plasmidkarte pCIIM-5 Xba

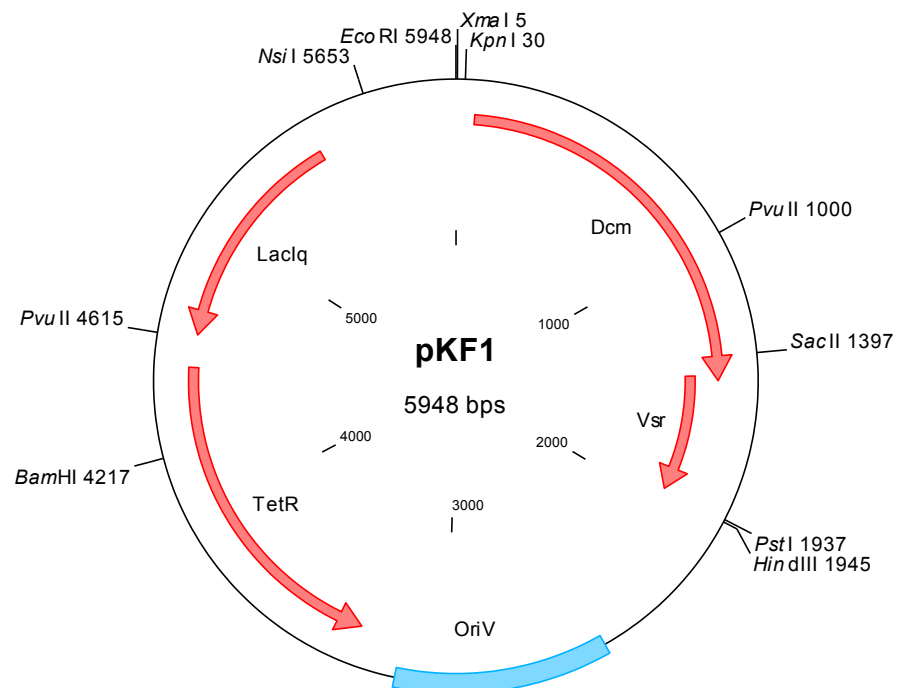
***pKF1***

Abbildung 69: Darstellung des Vektors pKF1

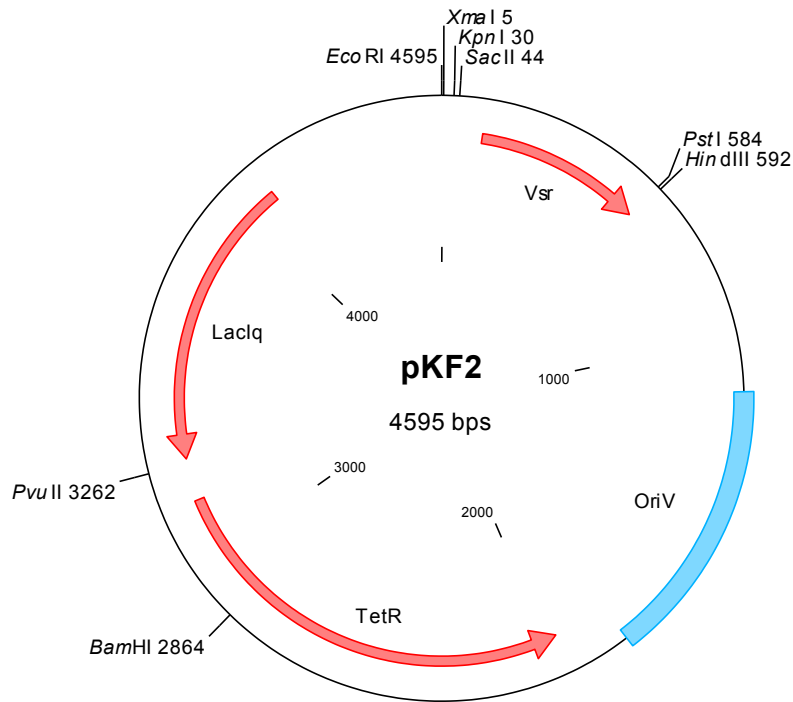
***pKF2***

Abbildung 70: Darstellung des Vektors pKF2

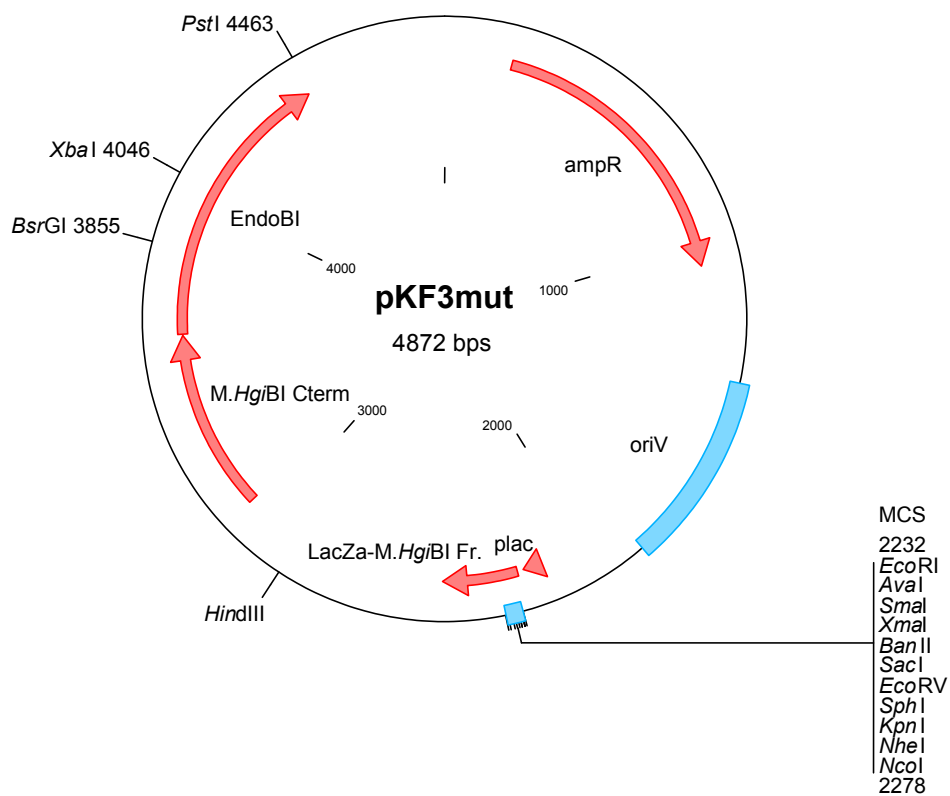
***pKF3mut***

Abbildung 71: Plasmidkarte des Vektors pKF3mut

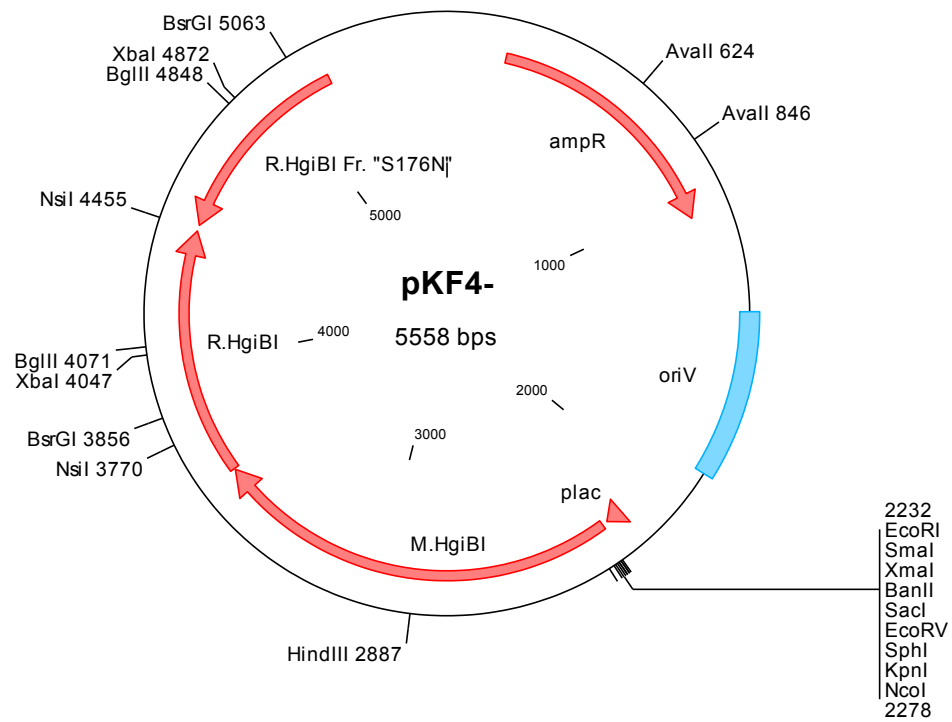
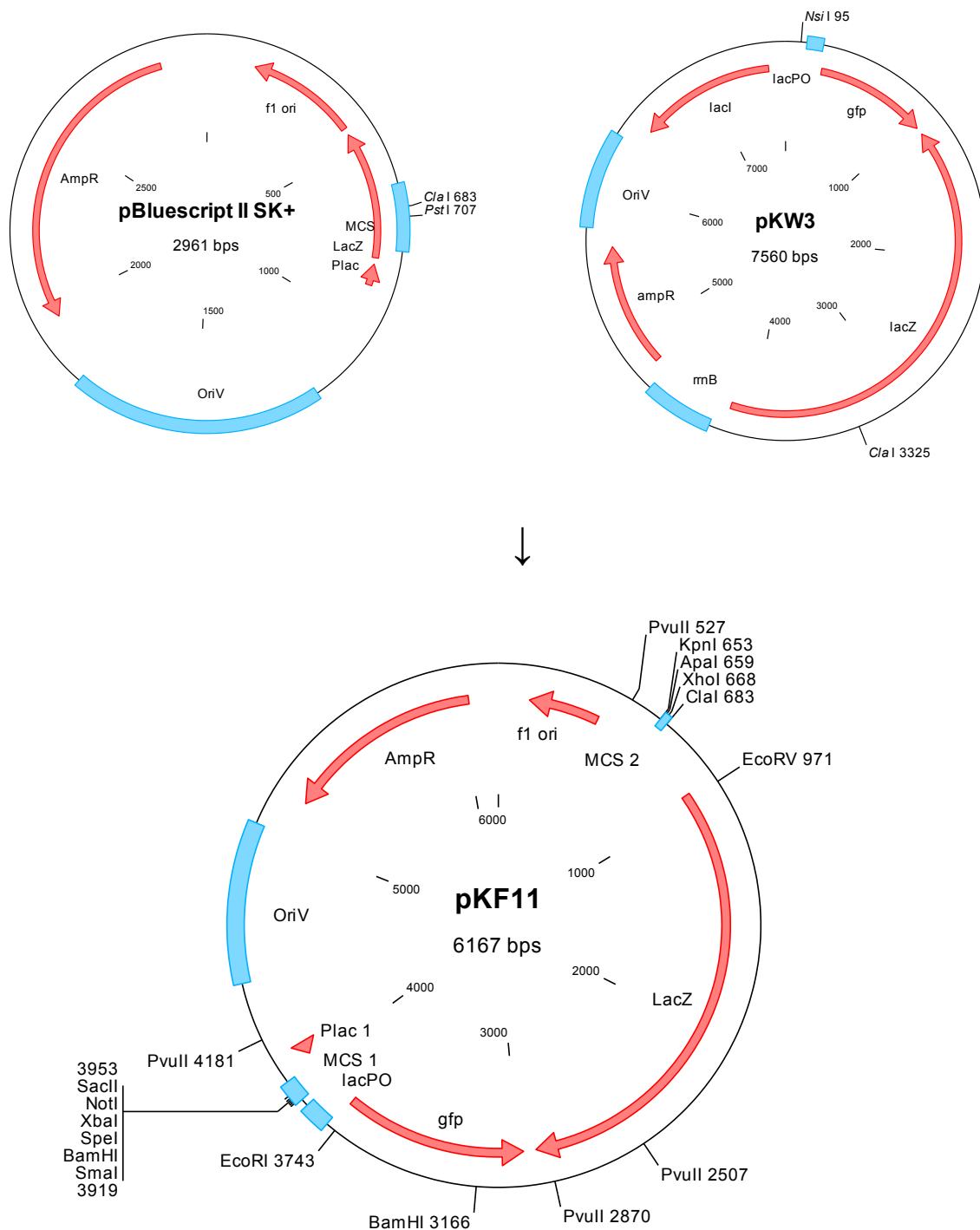
***pKF4-***

Abbildung 72: Darstellung des Vektors pKF4-

## 9.2 Herstellung von Plasmiden

### 9.2.1 Herstellung des Plasmides pKF11



**Abbildung 73: Herstellung des PLasmides pKF11.** Hierzu wurde der Vektor pKW3 verdaut mit *ClaI* und *NsiI*, das entstandene kleinere Fragment wurde in pBluescript II SK+, welches mit *ClaI* und *PstI* geschnitten wurde, eingefügt.

### 9.3 Bedingungen für den Verdau von pKF10

In Tabelle 49 sind die Bedingungen für die Verdaue von pKF10 mit den verschiedenen Restriktionsenzymen dargestellt.

**Tabelle 49: Bedingungen für die Verdaue von pKF10.** LS= Nidrigsalzpuffer= Puffer 1+ BSA von NEB, HS= Hochsalzpuffer= Puffer R von Fermentas. Bezeichnungen der Klone siehe folgende Tabellen. Grau hinterlegt sind Verdaue, die nicht mit pKF10 sondern mit pUC19 durchgeführt worden sind.

Enzym	Klone	Salz- bedingungen	Tempe- ratur	Enzym- volumen	pKF10 aus	Zeit	Proben
R.HgiBI	X1-X4	LS	47°C	8µl	SURE®	16h 43min	Sofort
	X5	LS	47°C	2µl	BL21	16h 45min	Sofort
	X6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	LS	47°C	4µl	BL21	16h 45min	Sofort
	XB	LS	47°C	4µl	BL21	4h	Glycerin
R.HgiEI	E1, 2, 3, 4, 5,	LS	47°C	2µl	SURE®	17h 14min	Glycerin
	E6, 7, 10, 11, 13	LS	47°C	2µl	SURE®	15h 58min	Glycerin
	E14	HS	47°C	2µl	SURE®	15h 58min	Glycerin
	E15, 16, 17	LS/HS?	47°C	2µl	SURE®	15h 58min	Glycerin
	E18-E26	HS	47°C	2µl	BL21	2h	Glycerin
	RE1-2	HS	47°C	1µl	BL21	4h	Sofort
	RE3-10	HS	47°C	2µl	BL21	4h	Sofort
	RE11-13, 14, 15	HS	47°C	4µl	BL21	4h	Sofort
R.HgiCII	C1-C5	LS	37°C	2µl	SURE®	16h 55min	?
	C6-C7	LS	37°C	2µl	SURE®	17h 29min	?
	HC1-HC12	HS	47°C	1,5µl	SURE®	2h	Glycerin
R.HgiBI S176N	B1-B5	LS	47°C	2µl	SURE®	17h 14min	Glycerin
	B6, <u>B7</u> (LS/HS???)	LS	47°C	2µl	SURE®	15h 58min	Glycerin
	B8-B21	LS	47°C	2µl	SURE®	17h 29min	Glycerin
R.HgiBI T119I	T119I 1-5	LS	47°C	2µl	BL21	4h	Glycerin
R.HgiBI T119N	T119I 1-3	LS	47°C	4µl	BL21	2h	Glycerin
R.HgiBI SN	SNB1-7	LS	47°C	0,5µl	?	2h	?
R.HgiEI NI	EI NI 1-8	HS	47°C	1µl	?	4h	Sofort
R.HgiEI SI	EI SI 1-7	LS	47°C	4µl	BL21	4h	Sofort

Fortsetzung von Tabelle 49, Erklärungen siehe Seite vorher

Enzym	Klone	Salz- bedingungen	Tempe- ratur	Enzym- volumen	pKF10 aus	Zeit	Proben
R. <i>Hgi</i> EI SN	SNE1-7	LS	47°C	2µl	SURE®	2h	?
R. <i>Hgi</i> EI TNI	TNI-1	LS	47°C	1µl	SURE®	4h	Sofort
R. <i>Hgi</i> EI TSN	ETSN1- 15	LS	47°C	10µl, 5µl, 1µl	SURE®	?	?
R. <i>Hgi</i> EI I119T	E119 1- 12	HS	47°C	4µl	SURE®	2h	Sofort
R. <i>Hgi</i> EI TSI	TSI 1-11	LS	47°C	4µl	SURE®	2h	Sofort
	TSI 13- 15	LS	47°C	4µl	SURE®	2h	Sofort
	TSI 16- 17	LS	47°C	4µl	SURE®	4h	Sofort
R. <i>Hgi</i> BI S176N Δ24bp	234-1	LS	37°C	1µl	SURE®	2h	Sofort
	234-2 – 234-10	LS HS	47°C 37°C	1µl	SURE®	2h	Sofort
	P234-1 - 21	LS	37°C? 47°C?	1µl	SURE®	2h	Sofort
R. <i>Hgi</i> BI Δ24	Δ24-1	LS	47°C	2µl	BL21	2h	Sofort

## 9.4 Originaldaten Nebenaktivitäten

Im Weiteren werden die Originaldaten der einzelnen Klone, die bei der Nebenaktivität sequenziert wurden, dargestellt. Auf diesen Daten basiert die Tabelle 47. Unterstrichen sind die Sequenzen aus pKF10, mit / markiert der Übergang zwischen pKF10 und GFP-Fragment. Grau markiert sind in Tabelle 47 mit einfließende Daten.

### 9.4.1 R.*Hgi*BI Wildtyp

Tabelle 50 stellt die Rohdaten von R.*Hgi*BI WT dar.

**Tabelle 50: Rohdaten Nebenaktivität R.*Hgi*BI WT.** X= Laborbezeichnung der Klon.

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
X2/GFPstop	<u>CAAAAGGCCAGGAAC/</u> CGTAAAAAGGC	746
X2/startGFP2	CAAAAGGCCAGG/ <u>AACCGTAAAAAGGC</u>	744
X3/GFPstop	<u>CCCGGTCGTCGGTT/</u> CAGGGCAGGGTC	2456
X3/startGFP2	CAAAAGGCCAGG/ <u>AACCGTAAAAAGGC</u>	744
X4/GFPstop	<u>CAAAAGGCCAGGAAC/</u> CGTAAAAAGGC	746
X4/startGFP2	CAAAAGGCCAGG/ <u>AACCGTAAAAAGGC</u>	744
XB/GFPstop	<u>TACCTATAACCAG/</u> ACCGTTCAGCTGG	1787
XB/startGFP2	CTGAAGCCAGT/ <u>TACCTTCGAAAAAG</u>	1249
X6/GFPstop	AAGAATA/ <u>GACCGAGATAGGGTTGAGT</u>	115
X6/startGFP2	<u>CAAAAGAATAGAC/</u> CGAGATAGGGTTG	117
X7/GFPstop	AAAGAATA/ <u>GACCGAGATAGGGTTGAG</u>	115
X7/startGFP2	<u>CAAAAGAATAGAC/</u> CGAGATAGGGTTG	117
X8/GFPstop	CAAAAGGCCAG/ <u>GAACCGTAAAAAGGC</u>	742
X8/startGFP2	<u>CAAAAGGCCAGGAAC/</u> CGTAAAAAGGC	746
X9/GFPstop	CAAAAGGCCAGG/ <u>AACCGTAAAAAGGC</u>	744
X9/startGFP2	<u>CAAAAGGCCAGGAAC/</u> CGTAAAAAGGC	746
X10/GFPstop	CAAAAGGCCAGG/ <u>AACCGTAAAAAGGC</u>	744
X10/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
X11/GFPstop	CAAAAGGCCAGG/ <u>AACCGTAAAAAGGC</u>	744
X11/startGFP2	<u>CAAAAGGCCAGGAAC/</u> CGTAAAAAGGC	746
X12/GFPstop	CAAAAGGCCAGG/ <u>AACCGTAAAAAGGC</u>	744
X12/startGFP2	<u>CAAAAGGCCAGGAAC/</u> CGTAAAAAGGC	746



### 9.4.2 R.HgiCII WT

Tabelle 51 stellt die Rohdaten der Nebenaktivitäten von R.HgiCII dar.

**Tabelle 51: Rohdaten Nebenaktivität R.HgiCII WT.** C= Unterschiedliche Bedingungen, HC= Hochsalzbedingungen

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
C1/GFP-stop	GAACGTGGA/CTCCAACGTCAAAGGG	178
C1/startGFP2	GCTCATTTTTTAACCAATAG/GCCGA	76
C4/GFPstop	GGTCGACGGT/ATCGATAAGCTTGAT	241
C4/StartGFP2	GGCGTTTTTCCAT/AGGCTCCGCCCC	778
C6/GFPstop	GCTCAGGCTCTCCCCGT/GGAGGTAA	2580
C6/startGFP2	CAAGAGTCCA/CTATTAAAGAACGTG	161
C7/GFPstop	AGAGCGGCCGCC/ACCGCGGTGGAGC	304
C7/StartGFP2	GCTCCGCCCCCTGACGAG/CATCAC	799
HC1/GFPstop	TGCCCTTAAACGCC/TGGTTGCTACG	2378
HC1/startGFP2	CGAAACCCGACAGGA/CTATAAAGAT	849
HC4/GFPstop	CAAGAGTCCACTATT/AAAGAACGTG	165
HC4/startGFP2	TTAAAGAACGTGGA/CTCCAACGTCA	178
HC6/ GFPstop	TTCTTGAAGTG/GTGGCCTAACTACG	1187
HC6/startGFP2	CTATAAAGATAACCAG/GCGTTTCCCC	862
HC8/GFPstop	GGATACATATTTGAAT/GTATTTAGA	2902
HC8/startGFP2	AGAACGTGGA/CTCCAACGTCAAAGG	178
HC9/ GFPstop	CATGGTCATAGCT/GTTTCCTGTGTG	380
HC9/startGFP2	TGTTCCCTTTAGT/GAGGGTTAATTG	338
HC10/GFPstop	GATATTACGGC/CTTTTTAAAGACCG	1812

### 9.4.3 R.HgiEI WT

In Tabelle 52 sind die Nebenaktivitäten von R.HgiEI gelistet.

**Tabelle 52: Nebenaktivitäten von R.HgiEI. E= unterschiedliche Bedingungen, RE= Hochsalz**

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
E1/GFP-stop	<u>CAGGAAGGCAAAAT/GCCGC</u>	2782
E1/start-GFP2	<u>CTTCCGC/TTCCTCGCTCAC</u>	598
E2/GFPstop	AAGGC/ <u>AAAATGCCGCAAAA</u>	2778
E2/start-GFP2	<u>TTTCTGATCAAA(A)A/GTGCTC</u> (A in Klammern zu viel!!!!!!!)	2623
E3/GFPstop	ACGTGGCCA/ <u>ATATGGACAAC</u>	2167
E3/StartGFP2	<u>TACCGGT/TTATTGACTACCGG</u>	2507
E4/GFPstop	<u>TTCGAAAGCAAATTC/GACCC</u>	2440
E4/startGFP2	ATTGTCTC/ <u>ATGAGCGGATACA</u>	2880
E5/GFPstop	CTGGC/ <u>GTTTTTCCATAGGC</u>	769
E7/GFP-stop	<u>TGAGGGTTAATT/GCGCGCTTGG</u>	349
E7/start-GFP2	TCGTGCCAGC/ <u>TGCATTAATGAA</u>	537
E8/GFP-stop	TCGGC/ <u>ACGTAAGAGGTTCCAA</u>	1588
E8/start-GFP2	<u>ATCCTTTGATCTT/TTCTACGGG</u>	1377
E10/GFPstop	<u>TGAGGGTTAATT/GCGCGCTTGG</u>	349
E10/start-GFP2	TCGTGCCAGC/ <u>TGCATTAATGAA</u>	537
E11/GFP-stop	Sequenz nicht in pKF10	
E11/startGFP2	<u>TGCCGCAAAAAGGGAA/TAAG</u>	2798
E13/GFP-stop	Sequenz nicht in pKF10	
E13/start-GFP2	<u>TGCCGCAAAAAGGGAA/TAAG</u>	2798
<u>E14/startGFP2</u>	GCT <u>ACGC/CTGAATAAGTGATAA</u>	2390
<u>E15/GFPstop</u>	TTGCTGGC/ <u>GTTTTTCCATAGGCT</u>	769
E16/GFPstop	TTGCTGGC/ <u>GTTTTTCCATAGGCT</u>	769
E16/startGFP2	<u>GTTATCCACAGAATC/AGGGGAT</u>	690
E18/GFPstop	<u>CGGAAGCAGTGT/GACCGTGTGCT</u>	2529
E18/startGFP2	TCATACTCTTCC/ <u>TTTTTCAATATTA</u>	2839
E21/GFPstop	<u>TCAAAAGTGCTCATC/ATTGGAAA</u>	2632
E21/startGFP2	GCCGCGTTGC/ <u>TGGCGTTTTTCCAT</u>	765
E24/GFPstop	<u>CCTGGTTGCTAC/GCCTGAATAAGT</u>	2387

Fortsetzung von Tabelle 52

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
E24/startGFP2	ACATGTGAGC/ <u>AAAAGGCCAGCAAAAGGCCA</u>	721
RE1/GFPstop	GTAATCATG/ <u>GTCATAGCTGTTTCCTGTGTG</u>	370
RE1/startGFP2	<u>GTAATCATGGTC</u> /ATAGCTGTTTCCTGTGTG	372
RE3/GFPstop	GTAATCATG/ <u>GTCATAGCTGTTTCCTGTGTG</u>	370
RE3/startGFP2	<u>GCGCTTGCGTAATCATGGTC</u> /ATAGCTGTT	372
RE4/GFPstop	TTGGCGTAATCATG/ <u>GTCATAGCTGTTTCCT</u>	370
RE4/startGFP2	GCGTAATCAT <u>GGTC</u> /ATAGCTGTTTCCTGTG	372
RE5/GFPstop	<u>ATAAATAAATCCTGGTGTC</u> /CCTGTTGATAC	1529
RE5/startGFP2	<u>GACTCGCTGCGCTCGGTC</u> /GTTTCGGCTGCGG	628
RE6/GFPstop	GCGCTCGGTCGTTTCG/ <u>GCTGCGGCGAGCGGT</u>	626
RE6/startGFP2	<u>CTCGCTGCGCTCGGTC</u> /GTTTCGGCTGCGGCG	628
RE7/GFPstop	TCAAAAGAATA/ <u>GACCGAGATAGGGTTGAGT</u>	115
RE7/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
RE9/GFPstop	GACTCGCTGCGCTCG/ <u>GTCGTTTCGGCTGCGG</u>	626
RE9/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
RE10/GFPstop	GACTCGCTGCGCTCG/ <u>GTCGTTTCGGCTGCGG</u>	626
RE10/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
RE11/GFPstop	GACTCGCTGCGCTCG/ <u>GTCGTTTCGGCTGCGG</u>	626
RE11/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
RE12/GFPstop	GCTGCGCTCG/ <u>GTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCG</u>	626
RE12/startGFP2	<u>GCTGCGCTCGGTC</u> /GTTTCGGCTGCGGCGAGCG	628
RE13/GFPstop	GACTCGCTGCGCTCG/ <u>GTCGTTTCGGCTGCGGCT</u>	626
RE13/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
RE15/GFPstop	GCTGCGCTCG/ <u>GTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGT</u>	626
RE15/startGFP2	<u>GACTCGCTGCGCTCGGTC</u> /GTTTCGGCTGCGGCG	628

#### 9.4.4 Mutanten *R.HgiBI*

In Tabelle 53 sind die Nebenaktivitäten von *R.HgiBI*-Mutanten gelistet.

**Tabelle 53: Nebenaktivitäten von *R.HgiBI*-Mutanten.** B= *R.HgiBI* S176N; T119N: *R.HgiBI* T119N; T119I: *R.HgiBI* T119I; SNB: *R.HgiBI* I223N

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
B2/GFPstop	AAACCGTCT/ <u>ATCAGGGCGA</u>	207
B3/GFP-stop	AAACCGTCT/ <u>ATCAGGGCGA</u>	207
B3/start-GFP2	<u>CACAACATA</u> /CGAGCCGGAA	424
B4/GFPstop	CGATGGCC/ <u>CCCCCTCGAG</u>	221
B4/startGFP2	<u>TTAATATTTT</u> /GTAAAATT	24
B5/GFPstop	CCTCGAG/ <u>GTCGACGGTATC</u>	232
B5/startGFP2	<u>GGAAGGCAAAAT</u> /GCCGCAA	2782
B6/GFP-stop	CGGTTTGCG/ <u>TATTGGGCGC</u>	580
B6/start-GFP	<u>TTGGAACAAGAG</u> /TCCACTA	156
B9/GFPstop	TTCCTTTTCA/ <u>ATATTATT</u>	2845
B9/startGFP2	GGTTCCGCGC/ <u>ACATTTCCC</u>	2937
B10/GFP-stop	<u>TTATTGACTAC</u> /CGGAAGCA	2517
B10/startGFP2	<u>AGCTGGATATTAC</u> /GGCCTT	1799
B12/GFPstop	GGAGCTCCAG/ <u>CTTTTGTTT</u>	322
B12/startGFP2	<u>TGGACTCCAAC</u> /GTCAAAGG	184
B13/GFPstop	GGAGCTCCAG/ <u>CTTTTGTTT</u>	322
B13/startGFP2	<u>TGGACTCCAAC</u> /GTCAAAGG	184
B14/GFPstop	GAGCTCCAG/ <u>CTTTTGTTCC</u>	322
B14/startGFP	<u>TGGACTCCAAC</u> /GTCAAAGG	184
B16/GFPstop	GTATCGATA/ <u>AGCTTGATAT</u>	248
B16/startGFP2	<u>GGGCGAAAAA</u> /CCGTCTATC	200
B17/GFPstop	GTGGACTCCA/ <u>ACGTCAAAG</u>	183
B17//startGFP2	<u>TGTTGTTCCAG</u> /TTTGGAAC	143
T119N1/GFPstop	<u>TTATTGAAGC</u> /ATTTATCAA	2857
T119N1/startGFP2	<u>CTATCAGGGCG</u> /ATGGCCCC	215
T119N2/GFPstop	<u>GCCGGAAGC</u> /ATAAAGTGTA	436
T119N2/startGFP2	<u>TAAGCTTGAT</u> /ATCGAATTCC	255
T119N3/GFPstop	<u>GAACCGTAAAA</u> /AGGCCGCGT	752
T119N3/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	

Fortsetzung von Tabelle 53

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
T119I1/GFPstop	<u>AAAGGGCGAA/AAACCGTCTA</u>	198
T119I1/startGFP2	<u>TTTAACCAATA/GGCCGAAAT</u>	75
T119I3/GFPstop	<u>GACCGTGTGC/TTCTCAAATG</u>	2540
T119I3/startGFP2	<u>TGTTAAATCAG/CTCATTTTT</u>	57
T119I5/GFPstop	<u>TGAATCGGCC/AACGCGCGGG</u>	555
T119I5/startGFP2	<u>GCCTAATGAGT/GAGCTAACT</u>	468
SNB1/GFPstop	<u>CGCTCTGGAG/TGAATACCAC</u>	2003
SNB1/startGFP2	<u>GGGTTATTGT/CTCATGAGCG</u>	2878
SNB2/GFPstop	<u>AAGTGCC/ACCTAAATTGTAA</u>	2958
SNB2/startGFP2	<u>TTTTTCAATAT/TATTGAAGC</u>	2849
SNB3/GFPstop	<u>AAATCAGCTC/ATTTTTTAAC</u>	61
SNB3/startGFP2	<u>GAATACTCAT/ACTCTTCCTT</u>	2830
SNB4/GFPstop	<u>AAGTGCC/ACCTAAATTGTAA</u>	2958
SNB4/startGFP2	<u>TTTTTCAATAT/TATTGAAGC</u>	2849
SNB5/GFPstop	<u>TTCACATTCT/TGCCCCGCCTG</u>	1871
SNB5/startGFP2	<u>AATTCCAC/ACAACATACGAG</u>	418
SNB6/GFPstop	<u>GGCCC/CCCCCTCGAGGTCGA</u>	223
SNB6/startGFP2	<u>GGGTTGAGTGTTG/TTCCAGT</u>	137
SNB7/GFPstop	<u>CTGGGGTGC/CTAATGAGTGA</u>	461
SNB7/startGFP2	<u>CTGTTTCCTG/TGTGAAATTG</u>	387

### 9.4.5 *R.HgiEI* Mutanten

In Tabelle 54 sind die Nebenaktivitäten von *R.HgiBI*-Mutanten gelistet.

**Tabelle 54: Nebenaktivitäten von *R.HgiBI*-Mutanten.** EISI: *R.HgiEI* N176S N223I; TSI: *R.HgiEI* I119T N176S N223I; E119: *R.HgiEI* I119T; I119N: *R.HgiEI* I119N; EINI: *R.HgiEI* N223I; SNE: *R.HgiEI* N176S

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
EISI2/GFPstop	GGCCAACGCGC/ <u>GGGGAGAGGCGGTTTGCGT</u>	562
EISI2/startGFP2	<u>CCTGGGGTGCCTAAT</u> /GAGTGAGCTAACTCA	464
EISI4/GFPstop	<u>GCCAGTTTGCTCAGGCTCTCCCC</u> /GTGGAGG	2578
EISI4/startGFP2	GACTCCAAC/ <u>GTCAAAGGGCGAAAAACCGTC</u>	185
EISI5/GFPstop	<u>G TTCAGGGCAGGGTCGT</u> /TAAATAGCCGCTT	2470
EISI5/startGFP2	<u>ACGCGCAGAAAAAAA</u> /GGATCTCAAGAAGAT	1351
E119 1/GFPstop	<u>TTGACTACCGGAAGCAGTGTGAC</u> /CGTGTGC	2533
E119 1/startGFP2	<u>GCGCTTGGCGTAATCATGGTC</u> /ATAGCTGTTT	373
E119 2/GFPstop	<u>TTCAGGGCAGG</u> /GTCGTTAAATAGCCGCTTAT	2467
E119 2/startGFP2	<u>GTCGGTTCAGGGCAGGGTC</u> /GTTAAATAGCC	2469
E119 3/GFPstop	<u>TCGCTGCGCTCG</u> /GTCGTTTCGGCTGCGGCG	627
E119 3/startGFP2	<u>AAGCAAATTCGACCCGGTC</u> /GTCGGTTCAGG	2449
E119 6/GFPstop	<u>G TTCAGGGCAGGGTC</u> /GTTAAATAGCCGCTTA	2468
E119 6/startGFP2	<u>AGGGCAGG</u> /GTCGTTAAATAGCCGCTTATG	2467
E119 7/GFPstop	<u>TCAGGGCAGG</u> /GTCGTTAAATAGCCGCTTAT	2467
E119 7/startGFP2	<u>TCGGTTCAGGGCAGGGTC</u> /GTTAAATAGCCG	2468
E119 8/GFPstop	<u>TGACTCGCTGCGCTCGGTC</u> /GTTTCGGCTGCG	629
E119 8/startGFP2	<u>CGCTGCGCTCG</u> /GTCGTTTCGGCTGCGGCGAG	627
E119 10/GFPstop	<u>TCAGGGCGATG</u> /GCCCCCCCCCTCGAGGTC	219
E119 10/startGFP2	<u>CCGTCTATCAGGGCGATGGCC</u> /CCCCCCTCG	221
E119-12/GFPstop	<u>TGTGATGGCTTCC</u> /ATGTCGGCAGAATGCTTA	2282
E119 12/startGFP2	<u>CTTCGCCCCCGTTTTCA</u> CC/ATGGGCAAATAT	2200
I119N1/GFPstop	<u>TCGGTTCAGGGCAGG</u> /GTCGTTAAATAGCCG	2466
I119N1/startGFP2	<u>TCGGTTCAGGGCAGGGTC</u> /GTTAAATAGCCGC	2468
I119N2/GFPstop	<u>CGCGCTTGGCGTAATCATG</u> /GTCATAGCTGTTT	370
I119N2/startGFP2	<u>CGCGCTTGGCGTAATCATGGTC</u> /ATAGCTGTTT	372

Fortsetzung Tabelle 54

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
I119N4/GFPstop	<u>ATATTACGGCCTTTTAAAGAC/CGTAAAGA</u>	1822
I119N4/startGFP2	<u>GGCCTTTTAAA/GACCGTAAAGAAAAATA</u>	1820
I119N6/GFPstop	<u>GACTCGCTGCGCTCG/GTCGTTCTGGCTGCGG</u>	626
I119N6/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
I119N7/GFPstop	<u>TCAGGGCAGG/GTCGTAAATAGCCGCTTAT</u>	2466
I119N7/startGFP2	<u>TCGGTTCAGGGCAGGGTC/GTTAAATAGCCG</u>	2468
I119N9/GFPstop	<u>AAAGCAAATTCGACCCGGTC/GTCGGTTCAG</u>	2449
I119N9/startGFP2	<u>TCGCTGCGCTCGG/TCGTTCTGGCTGCGGCGA</u>	627
I119N10/GFPstop	<u>GCAAATTCGACCCGGTC/GTCGGTTCAGGGC</u>	2449
I119N10/startGFP2	<u>CTCGCTGCGCTCGG/TCGTTCTGGCTGCGGCG</u>	627
I119N11/GFPstop	<u>GCAAATTCGACCCG/GTCGTCGGTTCAGGGC</u>	2447
I119N11/startGFP2	<u>TCGGTTCAGGGCAGGGTC/GTTAAATAGCCG</u>	2468
I119N12/GFPstop	<u>GCAAATTCGACCCGGTC/GTCGGTTCAGGGC</u>	2449
I119N12/startGFP2	<u>CTCGCTGCGCTCGG/TCGTTCTGGCTGCGGCG</u>	627
I119N13/GFPstop	<u>AAGCAAATTCGACCCGGTC/GTCGGTTCAGG</u>	2449
I119N13/startGFP2	<u>CTCGCTGCGCTCGG/TCGTTCTGGCTGCGGCG</u>	627
I119N15/GFPstop	<u>TATAAATCAAAAGAATAGAC/CGAGATAGG</u>	117
I119N15/startGFP2	<u>TATAAATCAAAAGAATA/GACCGAGATAGG</u>	115
I119N17/GFPstop	<u>ACCCCCCGTTCAGCCCGAC/CGCTGCGCCTT</u>	1051
I119N17/startGFP2	<u>ACCCCCCGTTCAGCCC/GACCGCTGCGCCTT</u>	1049
I119N18/GFPstop	<u>GACTCGCTGCGCTCGGTC/GTTCGGCTGCGG</u>	629
I119N18/startGFP2	<u>GACTCGCTGCGCTCG/GTCGTTCTGGCTGCGG</u>	626
I119N20/GFPstop	<u>CTCGCTGCGCTCGG/TCGTTCTGGCTGCGGCG</u>	627
I119N20/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
I119N21/GFPstop	<u>ACTGACTCGCTGCGCTCGGTC/GTTCGGCTG</u>	628
I119N21/startGFP2	<u>ACTGACTCGCTGCGCTCG/GTCGTTCTGGCTG</u>	626
I119N22/GFPstop	<u>GGTTCAGGGCAGGGTC/GTTAAATAGCCGC</u>	2468
I119N22/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
TSI 1/GFPstop	<u>CAAAAGGCCAGGAAC/CGTAAAAAGGCCGC</u>	746
TSI 1/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
TSI 2/GFPstop	<u>CGGAAATGTTGAATAC/TCATACTCTTCCTT</u>	2825
TSI 2/startGFP2	<u>CTAAATTGTAAGC/GTTAATATTTTGTTAAA</u>	14

Fortsetzung Tabelle 54

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
TSI 3/GFPstop	<u>CGGAAATGTTGAATAC/TCATACTCTTCCTT</u>	2826
TSI 3/startGFP2	<u>CTAAATTGTAAGC/GTTAATATTTTGTAAAA</u>	14
TSI 4/GFPstop	<u>CAAAAGGCCAGG/AACCGTAAAAAGGCCGCG</u>	743
TSI 4/startGFP2	Sequenz nicht interpretierbar	
TSI 5/ GFPstop	<u>GCAAAAGGCCAGG/AACCGTAAAAAGGCCGCG</u>	743
TSI 5/startGFP2	<u>GCAAAAGGCCAGGAAC/CGTAAAAAGGCCGCG</u>	745
TSI 6/ GFPstop	<u>GCAAAAGGCCAGGAAC/CGTAAAAAGGCCGCG</u>	745
TSI 6/startGFP2	<u>GCAAAAGGCCAGG/AACCGTAAAAAGGCCGCG</u>	743
TSI 7/GFPstop	<u>CTGGCGATTGAG/GTTCATCATGCCGTTTGT</u>	2253
TSI 7/startGFP2	Sequenz nicht in pKF10	
TSI 8/GFPstop	<u>GCCGGAAGC/ATAAAGTGTAAGCCTGGGGT</u>	437
TSI 8/startGFP2	<u>AGCTTTTGTTCCTTTAGTG/AGGGTTAATT</u>	340
TSI 9/GFPstop	Sequenz nicht interpretierbar	
TSI 9/startGFP2	<u>GCAAAAGGCCAGG/AACCGTAAAAAGGCCGCG</u>	743
TSI 10/GFPstop	<u>GCAAAAGGCCAGGAAC/CGTAAAAAGGCCGCG</u>	743
TSI 10/startGFP2	<u>GCTGTGTGCACGAAC/CCCCCGTTCAGCCCG</u>	1035
TSI 11/GFPstop	Sequenz nicht interpretierbar	
TSI 11/startGFP2	<u>GCAAAAGGCCAGG/AACCGTAAAAAGGCCGCG</u>	744
TSI 14/GFPstop	<u>GGTCATGAGATTATCAAAAA/GGATCTTCAC</u>	1449
TSI 14/startGFP2	<u>ACGGAAGATC/ACTTCGCAGAATAAATAAAT</u>	1501
TSI 16/GFPstop	<u>TAAATTGTAAGCGTTAATAT/TTTGTAAAA</u>	21
TSI 16/startGFP2	<u>AAATTGTTATCCGCTCA/CAATTCCACACAA</u>	408
TSI17/GFPstop	<u>GGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC/CGTAAAAAG</u>	745
TSI17/startGFP2	<u>CAAAAGGCCAGG/AACCGTAAAAAGGCCGCG</u>	743
TSI20/GFPstop	<u>ATGCCGCAAAAAAGGGAATAA/GGGCGACACG</u>	2801
TSI20/startGFP2	<u>GGTTATTGTCTC/ATGAGCGGATACATATTTG</u>	2880
TSI21/GFPstop	<u>ATGCCGCAAAAAAGGGAATAA/GGGCGACACG</u>	2801



Fortsetzung Tabelle 54

Klon/Primer	Sequenz	Position #1 in pKF10
TSI21/startGFP2	<u>GGTTATTGTCTC/ATGAGCGGATACATATTTGAATGT</u>	2880
TSI22/GFPstop	<u>AAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAA/GGGCGACACG</u>	2801
TSI22/startGFP2	<u>GGTTATTGTCTC/ATGAGCGGATACATATTTGAATGT</u>	2880
TSI23/GFPstop	<u>CATAGGCTCCG/CCCCCTGACGAGCATCACAAAAA</u>	787
TSI23/startGFP2	<u>AACTTTTGGCGAAAATGAGACGTTGA/TCGGCACGT</u>	1574
TSI24/GFPstop	<u>AGCCTGGGGTGCCTAATGAGT/GAGCTAACTCACAT</u>	468
TSI24/startGFP2	<u>CCCCCTGGAAG/CTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCG</u>	880
SNE2/startGFP2	<u>TAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT/TTTTTAACCAATA</u>	62
SNE7/GFPstop	<u>CCAACCTTCACC/ATAATGAAATAAGATCACTACCGG</u>	1613
SNE7/startGFP2	<u>CACTTCGCAGAATAAATAAATCC/TGGTGTCCCTG</u>	1523
EINI1/GFPstop	<u>GCAAAAAAGGGAATAA/GGGCGACACGGAAATGTT</u>	2802
EINI1/startGFP2	<u>GGGGATCCACTA/GTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCG</u>	288
EINI2/GFPstop	<u>GAACAAGA/GTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCC</u>	156
EINI2/startGFP2	<u>GACTACCGGAAGCAGTGT/GACCGTGTGCTTCTCAA</u>	2530
EINI3/GFPstop	<u>GCAAAAAAGGGAATAA/GGGCGACACGGAAATGTT</u>	2802
EINI4/GFPstop	<u>GAACAAGA/GTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCC</u>	156
EINI7/GFPstop	<u>AATATTATTGAAGCATTTATCA/AGGGTTATTGTCTC</u>	2866
EINI7/startGFP2	<u>TTTTTGTTAAATC/AGCTCATTTTTTAACCAATAGGC</u>	56
EINI8/GFPstop	<u>AGCTCATTTTTTAACCAATAG/GCCGAAATCGGCAA</u>	76
EINI8/startGFP2	<u>CGAGGTCGA/CGGTATCGATAAGCTTGATATCGAAT</u>	238
ETSN4/GFPstop	<u>GTCGGGAAACC/TGTCGTGCCAGCTGCATTAATG</u>	526
ETSN4/startGFP2	<u>GCCGAAATCGGC AAAAT/CCCTTATAAATCAAAAG</u>	93
ETSN11/GFPStop	<u>CCCTGTTGATACCGGGAAGC/CCTGGGCCAACTTTT</u>	1549
ETSN11/startGFP2	<u>AAATCCT/GGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCT</u>	1525
ETSN16/GFPStop	<u>CTATTAAAGAAC/GTGGACTCCAACGTCAAAGGGC</u>	173
ETSN16/startGFP2	<u>GTACTGCGATGAGTGGCAG/GGCGGGGCGTAATTTT</u>	2331
TNI1-1 GFPstop	<u>ATCAGCTCATTTTTTAACCAAT/AGGCCGAAATCGGCA</u>	74
TNI1-1 startGFP2	Sequenz nicht in pKF10	

### 9.4.6 Nebenaktivität *R.HgiBI* S176N Δ24

Tabelle 55 stellt die Nebenaktivitäten von *R.HgiBI* S176N Δ24 dar.

**Tabelle 55: Nebenaktivität *R.HgiBI* S176N Δ24.** Für die Bezeichnung der Klone siehe Tabelle 49. 234- und R234-Klone wurden aus pKF10 hergestellt, P234-Klone stellen verdautes pUC19 dar.

Name des Klons	Sequenz	Position #1
234-1/GFPstop	<u>ACCGGAAGCAGTGTGACC/GTGTGCTTCTCAAA</u>	2534
234-1/startGFP2	<u>TCGATGTAACCCA/CTCGTGCACCCAACTGATC</u>	2707
234-2/GFPstop	<u>AGAACAT/GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCC</u>	716
234-2/startGFP2	<u>TGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC/GGGGCGA</u>	2650
234-7/GFPstop	<u>ACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTA/AAGGG</u>	2089
234-7/startGFP2	<u>ATGGCAATGAAAGACGGTG/AGCTGGTGATATG</u>	1924
R234-2/GFPStop	<u>CCGTCTATCAGGGCG/ATGGCCCCCCCCCTCGAG</u>	216
R234-2/startGFP2	<u>CCGTCTATCAGGGCGATG/GCCCCCCCCCTCGAG</u>	218
R234-3/GFPStop	<u>GGGTGCCTAAT/GAGTGAGCTAACTCACATTAA</u>	560
R234-3/startGFP2	<u>TATCGAATTCCTGCAGC/CCGGGGGATCCACTA</u>	265
R234-4/GFPStop	<u>GGGCGATGGCCCCC/CCCTCGAGGTCGACGGTA</u>	225
R234-4/startGFP2	<u>ACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTT/CCAGTTTG</u>	139
R234-20/GFPstop	<u>CCTGGGGTGCCT/AATGAGTGAGCTAACTCACA</u>	463
R234-20/startGFP2	<u>GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAT/GCCGCAAAA</u>	2783
P234-1/GFPstop	<u>TCACAGCTTGTCTGTAAGCGGAT/GCCGGGAGC</u>	80
P234-1/startGFP2	<u>GATGCCGGGAGCA/GACAAGCCCGTCAGGGCGC</u>	91
P234-2/GFPstop	<u>CCTGCAGGC/ATGCAAGCTTGGCGTAATCATGG</u>	443
P234-2/startGFP2	<u>TATTTAGAAAAATAACAAAT/AGGGGTTCGC</u>	2579
P234-3/GFPstop	<u>ACGAGGCC/CTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGA</u>	2679
P234-3/startGFP2	<u>GAAACCATTATTATCATGACATTA/ACCTATAA</u>	2649
P234-6/GFPstop	<u>CAGGCGCCATTCGCC/ATTCAGGCTGCGCAACT</u>	248
P234-6/startGFP2	<u>CATTAACCTATAAAAATAGGCG/TATCACGAGG</u>	2666
P234-8/GFPstop	<u>TACTGAGAGTGC/ACCATATGCGGTGTGAAATA</u>	181
P234-8/startGFP2	<u>ACATTAACCTATAAAAATAGGCGT/ATCACGAGG</u>	2667
P234-12/GFPstop	<u>GAGAGTGCACC/ATATGCGGTGTGAAATACCGCA</u>	184
P234-12/startGFP2	<u>TGCACCATATGCGGTGTGAA/ATACCGCACAGAT</u>	197
P234-14/GFPstop	<u>AAGCCCGTCAG/GGCGCGTCAGCGGGTGTGGCG</u>	105

## Fortsetzung von Tabelle 55

Name des Klons	Sequenz	Position #1
P234-14/startGFP2	<u>TTAGAAAAATAAACAAATA</u> /GGGGTTCCGCGC	2580
P234-19/GFPstop	Nicht in pUC19	
P234-19/startGFP2	<u>ATGACATTAACCTATAAAAATA</u> /GGCGTATCA	
P234-21/GFPstop	AGTGCACCAT/ <u>ATGCGGTGTGAAATACCGCAC</u>	186
P234-21/startGFP2	<u>ATTATTATCATGACATTAACCT</u> /ATAAAAATAG	2653

9.4.7 Nebenaktivität Deletionsmutante *R.HgiBI*  $\Delta 24$ 

In Tabelle 56 werden die Nebenaktivitäten von *R.HgiBI*  $\Delta 24$  dargestellt.

Tabelle 56: Nebenaktivität *R.HgiBI*  $\Delta 24$ .

Name des Klons	Sequenz	Position #1
$\Delta 24$ -1/GFPstop	CGCGCTTGGC/GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG	361
$\Delta 24$ -1/startGFP2	<u>AAGCTTGATATCGAATTCC</u> /TGCAGCCCGGGGGATCC	265

## 10 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit oder Teile davon haben noch keiner anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegen.

Linda Falgenhauer

## 11 Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlichst bei denjenigen bedanken, aufgrund deren es mir möglich gewesen ist, diese Arbeit durchzuführen und zu beenden.

- Prof. Dr. Manfred Kröger, meinen „supervisor“ der mir ermöglicht hat, die vorliegende Arbeit im Labor L250 im IFZ durchzuführen. Danke für alle Anleitung, für jegliche Hilfestellung!
- Herrn Prof. Dr. Pingoud für die Übernahme der Funktion als Zweitgutachter
- Sabine und Susanne aus Labor L250/L032, meine lieben Kolleginnen, welche mir mit allen praktischen Sachen geholfen haben, und das beste Sequenzier-Team der Welt sind! Danke für die liebe Aufnahme im Labor, es waren schöne vier Jahre mit euch!
- Meiner Mama, meinen Geschwistern Jane und Ben für alle Hilfe und Unterstützung, ohne Euch hätte ich es nicht geschafft!
- Meiner restlichen Familie für alle Unterstützung, besonders meiner Tante Ruti, meinem Onkel Igor, meinen Cousins Linda und Rachel und meiner ältesten Cousine Noemi: Děkuji vám za všechno a že jste na mě mysleli!
- Allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Mikro- und Molekularbiologie (FB08) für ihre Hilfe, besonders aber Angelika Balser, Ulrike Ruppert, Anja Bäcker, Verena Peuser, Sebastian Frühwirth und Steffen Wagner.